

ZUR ERSTELLUNG TRANSGENER KANINCHEN DURCH
DNA-MIKROINJEKTION IN ZYGOTENVORKERNE

Karin Ross

Disbui. München

1987



Aus dem Institut für Tierzucht und Tierhygiene
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Tierzucht
Vorstand: Prof. Dr. H. Kräußlich
Arbeit angefertigt unter Leitung von Priv.-Doz. Dr. Dr. habil. G. Brem

Zur Erstellung transgener Kaninchen durch
DNA-Mikroinjektion in Zygotenvorkerne

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Karin Ross
aus
München

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BMOC ₂	Brinsters Mice Ova Culture Medium 2
BR	Befruchtungsrate
BSA	Bovines Serum Albumin
BSM II	Basal Synthetic Medium II
CAP ^r	Chloramphenicol-Resistenzgen
CAT	Chloramphenicol-acetyl Transferase
DNA	Desoxyribonucleinsäure
cDNA	copy DNA
DR	Degenerationsrate
FKS	Fetales Kälberserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
gpt	Xanthine-guanine-phosphoribosyltransferase
GRF	Wachstumshormon-Releasingfaktor
HCG	Humanes Choriogonadotropin
hGH	Humanes Wachstumshormon
hMT II _A	Humanes-Metallothionein II
I.E.	Internationale Einheiten
IgM	Immunglobulin M
I.U.	International Units
KB	Künstliche Besamung
KG	Körpergewicht
KR	Konzeptionsrate
LH-RH	Luteinisierungs-Releasinghormon
METT-1	Mouse Euploid Totipotent Teratocarcinoma
mMT ₁	Mäuse-Metallothionein I
M-MuLV	Moloney Murines Leukämia-Virus
MSV	Murines Sarkoma Virus
Mx	Mx-Protein
Neo	Neomycin-Resistenz
n.T.	nach Transfer
Osm	Osmol
p.c.	post coitum
pLH	Hypophysäres Luteinisierungshormon
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotropin
PR	Pregnancy Rate
rGH	Ratten-Wachstumshormon
SV 40	Simian Virus 40

TCM 199

Tissue culture Medium 199

TK

Thymidinkinase

TO

Tryptophan Oxygenase

ToR

Totgeburtenrate

TR

Trächtigkeitsrate

ÜR

Überlebensrate

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. LITERATUR	2
2.1 Embryotransfer	2
2.1.1 Superovulation und Synchronisation	2
2.1.1.1 Superovulation	2
2.1.1.2 Ovulationsauslösung und Befruchtung	5
2.1.2 Embryogewinnung	8
2.1.2.1 Morphologie und Wanderung von Kaninchen- embryonen bis zur Implantation	8
2.1.2.2 Embryogewinnung in vivo	8
2.1.2.3 Embryogewinnung nach Schlachtung	10
2.1.3 Transfer	10
2.1.3.1 Eileitertransfer	11
2.1.3.2 Uterustransfer	11
2.1.3.3 Transferergebnisse	12
2.1.4 Faktoren die das Transferergebnis beeinflussen	13
2.1.4.1 Embryonen	13
2.1.4.2 Synchronität	15
2.1.4.3 Empfänger	16
2.1.5 Embryo-Kultur	18
2.1.5.1 In vitro Kultur	18
2.1.5.2 In vivo Kultur	20
2.2 Gentransfer	22
2.2.1 Methoden und Bedeutung der Erstellung transgener Säugetiere	22
2.2.1.1 Methoden	22
2.2.1.2 Bedeutung und Anwendung	22

2.2.2	Virusvermittelter Gentransfer	24
2.2.3	Gentransfer durch Erstellung von Chimären aus Embryonen und transgenen, totipotenten Zellen	27
2.2.3.1	Totipotente Zelllinien	27
2.2.3.2	Chimären aus totipotenten Zellen und Embryonen	28
2.2.3.3	Chimären aus transformierten, totipotenten Zellen	29
2.2.4	Gentransfer durch DNA-Mikroinjektion in Zygotenvorkerne	29
2.2.4.1	Methode	29
2.2.4.2	Der Metallothionein-Promotor	31
2.2.4.3	Genkonstrukte, die das Wachstum beeinflussen	33
2.2.5	Gentransfer durch DNA-Mikroinjektion beim Kaninchen	33
3.	MATERIAL UND METHODE	36
3.1	Material	36
3.1.1	Versuchstiere	36
3.1.2	Genkonstrukte	37
3.1.2.1	Wachstumshormon-Gen ($\text{mMT}_1\text{-hGH}$)	37
3.1.2.2	Tryptophan-Oxygenase-Promotor (TO-CAT)	38
3.1.2.3	Mx-Protein-Gen ($\text{hMT II}_A\text{-Mx}$)	38
3.1.2.4	Wachstumshormon-Releasingfaktor-Gen ($\text{mMT}_1\text{-GRF}$)	38
3.2	Methode	41
3.2.1	Superovulation und Ovulationsauslösung	41
3.2.2	Embryogewinnung und Beurteilung	41
3.2.3	Mikroinjektion von DNA	44
3.2.4	Transfer	44
3.2.5	Probenentnahme und Untersuchung	49

4. ERGEBNISSE	50
4.1 Embryogewinnung	50
4.1.1 Superovulation	50
4.1.1.1 Rasseeinfluß	50
4.1.1.2 Vergleich zwischen Tieren ohne vorherigen Versuchseinsatz mit vorgenutzten Kaninchen	51
4.1.1.3 Einfluß der Jahreszeit	53
4.1.1.4 Einfluß der Art der Embryogewinnung	53
4.1.2 Befruchtungsergebnis	56
4.1.2.1 Vergleich zwischen natürlichem Deckakt und künstlicher Besamung	57
4.2. Embryotransfer	59
4.2.1 Trächtigkeitsrate (TR)	59
4.2.1.1 Einfluß der Vorovulation	59
4.2.1.2 Einfluß des Ovarbefunds	60
4.2.1.3 Einfluß der Übertragungstechnik	60
4.2.1.4 Einfluß der Jahreszeit	61
4.2.2 Einfluß der Mikroinjektion	62
4.2.2.1 Vergleich der mikroinjizierten Genkonstrukte	63
4.2.2.2 Einfluß der Anzahl mikroinjizierter, transferierter Embryonen	64
4.3 Embryomanipulation	65
4.3.1 Degenerationsrate (DR) nach Mikroinjektion	65
4.3.2 Überlebensrate (ÜR) mikroinjizierter Embryonen nach Transfer	66
4.4 Jungtiere aus DNA-Mikroinjektion	69
4.4.1 Totgeburtenrate (ToR)	69



4.4.2	Integration der Fremd-DNA	70
4.4.2.1	mMT ₁ -hGH	70
4.4.2.2	mMT ₁ -GRF	70
5.	DISKUSSION	71
5.1.	Embryogewinnung und -transfer	71
5.2.	Mikroinjektion und transgene Tiere	80
6.	ZUSAMMENFASSUNG	87
7.	SUMMARY	90
8.	LITERATURVERZEICHNIS	92

1. EINLEITUNG

Die Möglichkeit, fremde Einzelgene in das Genom von Säugetieren zu integrieren, bietet ein breites Untersuchungsgebiet für die molekularbiologische Grundlagenforschung. Auch für die moderne Tierzucht ergeben sich viele neue Aspekte durch den Gentransfer. So könnte das gezielte Einbringen von Resistenzgenen zur Zucht krankheitsresistenter Nutztiere führen.

Die Gentransfermethode der Mikroinjektion wurde Anfang der Achtziger Jahre bei der Maus entwickelt (GORDON et al., 1980). Seither sind eine Vielzahl transgener Mäuselinien erstellt worden. Ziel neuerer Arbeiten ist es, diese Methode auf andere Tierarten zu übertragen. Kaninchenzygoten bieten sich mit ihrer Größe von ca. 140 μm und den gut sichtbaren Pronuclei zur Mikroinjektion an. Auch ist der experimentelle Aufwand weitaus geringer als bei den Großtieren.

Die Gesamteffektivität des Gentransfers ist aufgrund der vielen Einzelschritte im allgemeinen recht niedrig. Daher ist es notwendig, bei der Gewinnung und dem Transfer von Kaninchenzygoten eine möglichst hohe Effektivität und Qualität zu erzielen. Aufgabe dieser Arbeit war es, Faktoren zu untersuchen, die die Effektivität von Gentransferprogrammen beeinflussen.

Für den Gentransfer selbst, ist die Art der Beeinflussung durch das Genkonstrukt von Interesse: Für die vorliegende Arbeit standen vier verschiedene Konstrukte zur Verfügung, die in ihrer Eignung zur Erstellung transgener Kaninchen verglichen wurden.

Die Klonierung und Präparation der zur Mikroinjektion notwendigen DNA-Lösungen sowie die Untersuchung der Jungtiere auf Integration erfolgte im Rahmen der Dissertation von BRENIG (1987).

2. LITERATUR

2.1 EMBRYOTRANSFER

2.1.1 Superovulation und Synchronisation

Den ersten erfolgreichen Transfer von Säugetierembryonen beschrieb HEAPE (1891) beim Kaninchen. Er übertrug zwei Vierzelleembryonen einer Angorahäsin in den Eileiter eines Belgierkaninchens, welches drei Stunden vorher von einem Belgierrammer belegt worden war und erhielt einen Wurf von zwei Angora- und vier Belgierkaninchen. Erst 1922 gelang BIEDL et al. (1922) ein weiterer erfolgreicher Transfer beim Kaninchen. AUSTIN (1961) erstellte eine nach Tierarten gegliederte, tabellarische Liste der ersten Arbeiten über den Embryotransfer, aus der hervorgeht, daß erst 1933 bei einer weiteren Tierart, der Ratte, ein erfolgreicher Embryotransfer durchgeführt wurde (NICHOLAS, 1933).

Seit Ende der Vierziger Jahre begann der Embryotransfer - aufgrund der Entdeckung und dem Einsatz der gonadotropinen Hormone - in der Grundlagenforschung und in der Tierzucht breiteren Raum einzunehmen (ADAMS, 1982a).

Kaninchen sind, soweit die Umweltbedingungen wie Nahrungsangebot, Temperatur und Licht es erlauben, während des ganzen Jahres paarungsbereit. Sie besitzen keinen klar definierten Zyklus, da die Ovulation und die darauf folgende Entstehung von Corpora lutea normalerweise durch den Deckakt induziert werden. Diese Corpora lutea steuern bei Tieren mit zyklischer Ovulation den Zyklusverlauf. Ein steriler Deckakt oder andere Reize, die eine Ovulation auslösen, führen beim Kaninchen zu einer 16 bis 19 Tage dauernden Pseudogravidität. In dieser Zeit können keine weiteren Ovulationen erfolgen; die Tiere sind im allgemeinen nicht paarungsbereit und am Ende der Pseudogravidität zeigen Häsinnen oft Nestbauverhalten (HAMMOND und MARSHALL, 1925).

2.1.1.1 Superovulation

Superovulation bedeutet die Stimulierung der Ovarien zur Reifung einer höheren Anzahl sprungreifer Follikel (20 bis 60 anstatt 8 bis 10) durch intramuskuläre Applikation von gonadotropinen Hormonen. Es können

zwei unterschiedliche Hormone zur Superovulation eingesetzt werden:

- das hypophysäre, follikelstimulierende Hormon (FSH) oder
- Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG)

(PINCUS, 1940; KENNELLY und FOOTE, 1965; GABLER, 1970).

PINCUS (1940) testete als erster einige PMSG-Präparationen sowie die Hypophysenextrakte von Schaf und Pferd auf ihre superovulatorische Wirkung beim Kaninchen und kam zu dem Schluß, daß mit Hypophysenpräparaten bessere Ergebnisse zu erzielen sind. PARKES (1942) untersuchte Dauer und Dosis der Verabreichung von Pferdehypophysenextrakten zur Superovulation beim Kaninchen. Er ermittelte eine optimale Dauer von 5 Tagen und legte die Dosis nach dem Gewicht der Tiere fest. KENNELLY und FOOTE (1965) versuchten, eine optimale Hormonbehandlung für Holländerkaninchen zur Superovulation herauszufinden und orientierten sich nicht wie PARKES (1942) am Gewicht, sondern am Alter der Tiere. Das beste Ergebnis erzielten sie bei 16 Wochen alten Tieren mit 0,31 mg FSH, die über 3 Tage verteilt verabreicht wurden.

In Tabelle 1 und 2 sind einige Superovulationsergebnisse aus der Literatur aufgelistet. TSUTSUMI et al. (1980) (Zit. nach ADAMS, 1982b) erreichten mit durchschnittlich 61 Ovulationspunkten das beste Ergebnis mit PMSG. Die Applikation von FSH erfolgte zweimal täglich intramuskulär über einen Zeitraum von 3 Tagen, und die Ovulation wurde 24 Stunden nach der letzten FSH-Gabe ausgelöst. Bei der Superovulation mit PMSG wurden unterschiedliche Behandlungsschemata beschrieben.

Das Ergebnis der Superovulation beim Kaninchen zeigte sich abhängig von der Rasse und der Zuchtlinie. MAURER und FOOTE (1971) führten ein besonders schlechtes Superovulationsergebnis einer Versuchsgruppe auf eine bestimmte Kreuzungslinie zurück, die in dieser Tiergruppe - im Gegensatz zu den anderen Versuchsgruppen - besonders stark vertreten war. HAHN und GABLER (1971) erreichten bei normaler Ovulation bei genetisch nicht näher bestimmten Neuseeländerkaninchen verschiedener Herkunft durchschnittlich 8,25 Ovulationspunkte mit hoher Streuung der Ergebnisse ($s = \pm 3,07$) gegenüber 10,77 Ovulationspunkten mit geringer Streuung ($s = \pm 1,30$) bei F_1 -Kreuzungstieren schwarze Alaska x weiße Wiener. ROTTMANN und STRANZINGER (1977) ermittelten große Unterschiede

der Superovulationsergebnisse zwischen zwei unterschiedlichen Reinzuchtlinien weißer Neuseeländer.

Tabelle 1: Ergebnisse der Superovulation mit FSH

DOSIERUNG mg FSH pro Injektion	ANZAHL Ovulationen	AUTOREN
0,155	51,1	KENNELLY und FOOTE (1965)
0,3	46,5	MAURER et al. (1968a)
0,5	45,1	GABLER (1970)
0,3	39,3	MICHELMANN und PAUFLER (1974)
0,3	50,3	BRAUN (1977)

Tabelle 2: Behandlungsschemata und Ergebnisse der Superovulation mit PMSG

DOSIS (I.E.)	APPLI- KATION täglich	DAUER Tage	OVULATIONS- AUSLÖSUNG (Std. nach d. letzten PMSG-Gabe)	ANZAHL Ovula- tionen	AUTOREN
50	1 mal	3	24	38,5	HAFEZ (1961)
12,5	2 "	3	24	12	KENNELLY und FOOTE (1965)
30	1 "	3	48	13	MAURER et al. (1968a)
75	1 "	3	24	14,7	GABLER (1970)
60	einmalig		72	47,8	ROTTMANN und STRANZINGER (1977)
200	"		80	61	TSUTSUMI et al. (1980) (Zit. nach ADAMS, 1982b)

Durch Applikation gonadotropiner Hormone konnte das Ovar präpuberaler Kaninchen ab der zwölften Lebenswoche zur Reifung entwicklungsfähiger Eizellen angeregt werden (ADAMS, 1953), wobei gute Ergebnisse erst ab der sechzehnten Lebenswoche erreicht wurden (HERTZ und HISAW, 1934; KENNELLY und FOOTE, 1965).

PINCUS (1940) und ADAMS (1965 und 1982b) beobachteten, daß Eizellen, die aus Superovulation stammten, genauso befruchtungsfähig sind wie natürlich ovulierte Eizellen. MAURER et al. (1968b) untersuchten die Überlebensrate von Embryonen aus superovulierten und normal ovulierten Eizellen und kamen zu dem Schluß, daß sich beide gleich häufig zu lebenden Jungen entwickeln. Auch SCHILLING und KÜMEL (1985) kamen zu dem Ergebnis, daß Kaninchenembryonen aus Superovulation eine normale Befruchtungs- und Entwicklungspotenz besitzen. HAHN et al. (1977) fanden, daß die Superovulation gegenüber der einfachen Ovulation mit HCG keinen Einfluß auf die in vitro Befruchtung von Kanincheneizellen hat. Nach Transfer dieser in vitro befruchteten Eizellen entwickelten sich jedoch signifikant ($p < 0,05$) weniger Foeten aus den superovulierten Eizellen. HAHN et al. (1977) führten dieses Ergebnis auf Störungen in der Präimplantationsphase bei den superovulierten Eizellen zurück. ROTTMANN und STRANZINGER (1977) stellten eine um 20 % schlechtere Teilungsrate superovulierter Eizellen in Kultur fest und BRAUN (1977) berichtete von einem erheblich höheren Anteil an Entwicklungsstörungen bei superovulierten Kanincheneizellen.

Wurden Embryonen erst im Stadium der Blastozyste gewonnen, erwies sich die Superovulation als ungünstig, da nach dem Übertritt von mehr als 8 bis 10 Embryonen in den Uterus häufig Degenerationserscheinungen auftraten (ADAMS, 1960; GABLER, 1970). FUJIMOTO et al. (1974) stellten bei 10 % von aus Superovulation stammenden Blastozysten einen unnormalen Karyotyp fest und zogen daraus den Schluß, daß Blastozysten aus Superovulation als Testobjekte für Reproduktionsstudien ungeeignet sind.

2.1.1.2 Ovulationsauslösung und Befruchtung

Um zu vermeiden, daß sich ein Tier während des Versuchs im Stadium der Pseudogravidität befindet, wurden Kaninchen drei Wochen vor Versuchsbeginn in Einzelkäfigen gehalten. Bei jungen Tieren, die vorher noch nie in der Zucht benutzt wurden, erwies es sich als vorteilhaft, sie 20 Tage vor Versuchsbeginn zu ovulieren (ADAMS, 1982b).

Neben dem Deckakt, der natürlicherweise die Ovulation beim Kaninchen auslöst, kann die Ovulation auch hormonell induziert werden. Möglichkeiten und Dosierungsvorschläge der hormonellen Ovulationsinduktion aus der Literatur sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3: Methoden hormoneller Ovulationsauslösung

ART DER OVULATIONSINDUKTION	DOSIERUNG	AUTOREN
Humanes Choriongonadotropin (HCG), intravenös	I.E. 20 pro Tier 100 " " 20 " kg KG	PARKES (1942) GABLER (1970) MICHELMANN und PAUFLER (1974)
Hypophysäres Luteinisierungshormon (pLH), intravenös	mg 2 pro Tier 2,5 " " 0,5-0,65 " kg KG	PINCUS (1940) GABLER (1970) MICHELMANN und PAUFLER (1974)
Luteinisierungs-Releasinghormon (LH-RH), intramuskulär	µg pro Tier 10 - 20 0,5 0,8	MICHELMANN und PAUFLER (1974) REEL et al. (1976) ADAMS (1982b)

MICHELMANN und PAUFLER (1974) stellten keine signifikanten Unterschiede der Ovulationsergebnisse zwischen den 3 verschiedenen Hormonen fest. Die Anzahl der Corpora lutea je Tier lag mit durchschnittlich 7 bis 8 in dem Bereich, der auch beim natürlichen Deckakt erreicht wurde.

In Versuchen von HAMMOND und MARSHALL (1925) und HARPER (1963) lag der

Ovulationszeitpunkt bei Kaninchen nach dem natürlichen Deckakt sowie nach der intravenösen HCG-Applikation bei 9 1/2 bis 13 1/2 Stunden, während zwischen intramuskulärer LH-RH-Applikation und Ovulation 27 bis 30 Stunden verstrichen (ADAMS, 1982b).

Die Gabe von LH-RH zeigte gegenüber der Verabreichung von HCG den Vorteil, daß auch bei mehrmaliger Applikation keine Wirkungseinbußen durch Ausbildung einer Immunität auftraten (REEL et al., 1976).

Empfängertiere wurden zur Synchronisation, je nach Stadium und Behandlung der Embryonen, durch hormonelle Induktion oder durch den Einsatz eines vasektomierten Rammlers steril ovuliert (HAMMOND und MARSHALL, 1925; ADAMS, 1982b).

Für Spendertiere, die fertilisierte Eizellen liefern sollten, wurden in der Literatur folgende Ovulationsmöglichkeiten beschrieben:

- der natürliche Deckakt, der oft zur Synchronisation und Verstärkung der Ovulation mit einer zusätzlichen ovulationsauslösenden Injektion kombiniert wurde (PINCUS, 1940; ADAMS, 1982b).
- künstliche Besamung mit hormoneller Ovulationsauslösung (ADAMS, 1961; FOOTE et al., 1963; ADAMS und DOTT, 1966).

ROTTMANN und STRANZINGER (1977) werteten die Entwicklung von mindestens einer Zygote aller ovulierten Eizellen als Konzeption. 98 % der Kaninchen in ihren Versuchen hatten nach Superovulation und künstlicher Besamung konzipiert. Eine Konzeptionsrate von durchschnittlich 80 % bis 90 % erreichten ADAMS (1961) und FOOTE et al. (1963) nach hormoneller Superovulationsinduktion und künstlicher Besamung von Kaninchen.

Der Anteil befruchteter Eizellen aller gewonnenen Eizellen (Befruchtungsrates) lag bei superovulierten Tieren bei 96 % (ADAMS 1960) bzw. 71 % (ROTTMANN und STRANZINGER, 1977) im Gegensatz zu 99 % (ADAMS, 1960) bei nicht superovulierten Kaninchen.

2.1.2 Embryogewinnung

2.1.2.1 Morphologie und Wanderung von Kaninchenembryonen bis zur Implantation

Kaninchenembryonen sind im Vergleich zu anderen Säugetierembryonen relativ groß (ADAMS, 1965a). So beträgt der Durchmesser eines Kaninchenembryos ohne Muzinschicht bis 72 Stunden p.c. ca. 140 μm und expandiert bis zum Alter von 144 Stunden auf ca. 2300 μm (ADAMS, 1968). Außerdem zeichnen sich Kaninchenembryonen durch eine hohe Teilungsrate aus. Das Sechzehnzellstadium wird bereits ca. 40 bis 44 Stunden nach der Fertilisation erreicht, während Rinderembryonen dazu 192 Stunden benötigen (GOTTSCHESKI und ZIMMERMANN, 1973). Als einzige Säugerart besitzen Kaninchenembryonen eine dicke Muzinschicht aus sauren Mucopolysacchariden, die bei der Passage durch den Eileiter an die Zona angelagert wird (BRADEN, 1952).

GREENWALD (1958) zeigte, daß die Synthese und Speicherung des Muzins in den Eileiterzellen östrogenabhängig ist, während die Sekretion unter dem Progesteroneinfluß der Corpora lutea erfolgt. Durch Östrogengaben während der frühen Trächtigkeit erreichte er eine starke Verminderung der Muzinsekretion. Obwohl die Trächtigkeitsraten bei Embryonen mit stark reduzierter Muzinschicht deutlich geringer war als bei Kontroll-embryonen, war in einzelnen Fällen eine normale Expansion der Blastozyste und eine Implantation möglich (GREENWALD, 1961a).

In Tabelle 4 sind die Entwicklungsstadien von Kaninchenembryonen in Abhängigkeit von der Zeit nach dem Deckakt aufgelistet. Nach der Ovulation erfolgt die Wanderung von Kanincheizellen innerhalb von ca. 2 Stunden durch die erste Hälfte des Eileiters. In der zweiten Hälfte, dem Isthmus tubae verweilen sie dann für ca. 70 Stunden (CHANG, 1951; GREENWALD, 1961b).

2.1.2.2 Embryogewinnung in vivo

Die chirurgische Embryogewinnung ermöglichte es, Spendertiere mehrmals zu verwenden (AVIS und SAWIN, 1951; MAURER et al., 1968a).

ADAMS (1953 und 1982b) fand, daß die Embryonenausbeute bei in vivo Spülung geringer ist als bei Spülung der exstirpierten Organe.

MEIER (1972) konnte dies nicht bestätigen. Als weiteren Nachteil der in vivo Embryogewinnung sah ADAMS (1953) an, daß Embryonen im Genitaltrakt des Spendertieres verbleiben können, was zu ungewollten Trächtigkeiten führt. Auch MAURER et al. (1968a) beobachteten die Geburt von Jungtieren bei Spendern nach in vivo Spülung.

Tabelle 4: Embryonalstadien in Abhängigkeit der Zeit nach dem Deckakt (p.c.)

ZEIT p.c.	ENTWICKLUNGSPHASE	AUTOREN
9 1/2 bis 13 1/2 Std.	Ovulation	HAMMOND und MARSHALL (1925)
21 1/2 "	Erste Teilung	GOTTSCHESKI und ZIMMERMANN (1973)
bis 30 "	Zwei- bis Vierzeller	GABLER (1970)
" 36 "	Vier- bis Achtzeller	"
" 60 "	Morula	"
um 72 "	Übertritt in den Uterus u. Umbildung zur Blastozyste	GOTTSCHESKI und ZIMMERMANN (1973)
Tag 4	86 % expandierte Blastozysten	ROLOFF (1976)
Tag 5	nur exp. Blastozys.	"
ab Tag 6	Aufnahme der ersten Uterussekrete und Proteine über syncytiale Trophoblastensprossen	GOTTSCHESKI und ZIMMERMANN (1973)
Tag 8	Implantation	" " "

Bei Spülung von Embryonen aus dem Eileiter wurde die Bauchhöhle in der Flanke eröffnet und die Embryonen von der uterotubalen Verbindung aus durch einen in der Eileiterampulle installierten Schlauch oder eine Kanüle herausgespült (CHANG, 1952; MAURER et al., 1968a; HAFEZ, 1971). AVIS und SAWIN (1951) beschrieben die Spülung in umgekehrter Richtung vom Fimbrientrichter aus.

Die in vivo Spülung des Uterus erfolgte nach Medianschnitt in der Linea alba. Durch einen kleinen Schnitt in der Vaginalwand wurde die Cervix vorgelagert und ein Glasröhrchen in den Uterus geschoben. Das jeweilige Uterushorn wurde kranial mit einer scharfen Kanüle angestochen und von dort aus in Richtung Cervix gespült (VENGE, 1951; ROLOFF, 1976). HAHN und MEIER (1974) beschrieben eine Methode, bei der das Uterushorn kranial angestochen und mit 5 bis 10 ml Spülflüssigkeit aufgefüllt wurde. Anschließend wurde der Uterus kaudal erneut perforiert und die Flüssigkeit mit den Embryonen abgehebert.

TSUTSUMI et al. (1976) entwickelten eine unblutige Embryogewinnungsmethode beim Kaninchen: Embryonen, die durch Östrogengaben beschleunigt durch Eileiter und Uterus bis in die Vagina transportiert worden waren, spülten sie mit einem modifizierten Humanurethrakatheter aus der Vagina. Aus diesen Embryonen entwickelten sich nach Transfer lebende Jungtiere.

2.1.2.3 Embryogewinnung nach Schlachtung

ROTTMANN (1978) und ADAMS (1982b) beschrieben die Embryogewinnung nach Schlachtötung des Spenders.

Die Eileiter wurden ca. 2 cm kaudal der uterotubalen Verbindungsstelle vom Uterus abgesetzt. Ovarien und Gekröse wurden entfernt, so daß die Eileiter gestreckt werden konnten. Spülungen waren vom Fimbrien-trichter zum Isthmus tubae oder auch in umgekehrter Richtung möglich.

Blastozysten konnten bis 132 Stunden p.c. aus dem Uterus gewonnen werden. Nach Absetzen der Eileiter wurden die beiden Uterushörner voneinander getrennt, das Mesometrium sorgfältig entfernt und das Blut abgetupft. Der Uterus konnte in beiden Richtungen gespült werden (STAPLES, 1971; ADAMS, 1982b).

2.1.3 Transfer

Der Transfer von Kaninchenembryonen erfolgte im allgemeinen chirurgisch. Dazu wurden die Empfängerkaninchen in Vollnarkose gelegt und die Embryonen mit einer Glaspipette übertragen. Der Zugang für den Transfer von Embryonen in den Eileiter erfolgte meistens in der Flanke. CHANG und PICKWORTH (1969) beschrieben jedoch auch den Medianschnitt für den

Eileitertransfer. Beim Embryotransfer in den Uterus wurde die Bauchhöhle in der Medianen eröffnet.

Der unblutige Transfer durch Vaginalkanal und Cervix in den Uterus war beim Kaninchen nahezu unmöglich (ADAMS, 1982b).

2.1.3.1 Eileitertransfer

In Tabelle 5 sind einige Varianten des Eileitertransfers aus der Literatur dargestellt.

Tabelle 5: Methoden des Eileitertransfers

PIPETTEN- STÄRKE	MEDIUM- MENGE	ORT DER DEPOSITION IM EILEITER in cm vom Fimbrientrichter aus gemessen	AUTOREN
in mm	in ml		
2	0,05	0,5 - 1	CHANG (1950)
-	<0,5	-	AVIS und SAWIN (1951)
-	gering	2 - 3	MAURER et al. (1968b)
2	-	-	CHANG und PICKWORTH (1969)
-	-	2 - 3	GABLER (1970)
0,5-1,5	<0,1	1 - 2	MEIER (1972)

HAFEZ (1961) verglich den Transfer von Embryonen ins Infundibulum, 1 1/2 cm weit vom Fimbrientrichter entfernt, 2 1/2 cm weit vom Fimbrientrichter entfernt und in die Bursa ovarica. Der Transfererfolg betrug 75 % bis 77 % bei den Transferformen direkt in den Eileiter und 57 % bei Deposition der Embryonen in die Bursa ovarica.

2.1.3.2 Uterustransfer

Zwei unterschiedliche Verfahren des Uterustransfers wurden beschrieben:

- durch Punktion oder Inzision der Uteruswand wurden die Embryonen direkt in den Uterus eingebracht (DOWLING, 1949; CHANG, 1950; ADAMS, 1962; TESTART, 1969; STAPLES, 1971).
- in die dorsale Vaginalwand wurde ein Schnitt gelegt, durch den man die Portio vaginalis uteri der Cervix verschieben konnte und die Übertragungsspipette mit den Embryonen durch den Cervikalkanal in den Uterus einbrachte (ADAMS, 1956; DAUZIER, 1962; TESTART, 1969; STAPLES, 1971).

DAUZIER (1962) übertrug 4 1/2 Tage alte Blastozysten, sowohl mit als auch ohne Perforation der Vaginalwand, durch die Cervix in den Uterus und erhielt ohne Vaginalwandperforation deutlich schlechtere Ergebnisse. HAFEZ (1962) konnte keine statistischen Unterschiede bei der Übertragung von 3 Tage alten Morulae durch Uterusperforation oder Transfer durch den Cervikalkanal nach Scheidenwandinzision feststellen. TESTART (1969) erhielt bei der Übertragung von 4 bis 5 Tage alten Blastozysten direkt in den Uterus bessere Ergebnisse als bei Transfer durch die Cervix und stellte nach transcervicaler Übertragung bei 30 % der Empfängertiere Pyometren fest. MEIER (1972) beobachtete keine Infektionen nach Embryonenübertragung durch die Cervix. Demgegenüber beobachtete ROLOFF (1976) bei 29 % der Empfängertiere nach Transplantation von frisch gewonnenen Blastozysten verschiedener Entwicklungsstadien, sowohl nach transcervicalem als auch nach direktem Transfer in den Uterus, Veränderungen des Uterus mit Wandverdickungen und Füllung des Lumens mit nekrotischen Massen. Histologisch erwiesen sich die Prozesse als nicht entzündlich. Die Ursache konnte nicht geklärt werden.

2.1.3.3 Transferergebnisse

In Tabelle 6 sind einige Ergebnisse des Embryotransfers beim Kaninchen aufgelistet. Als Maßstab für die Beurteilung des Transfererfolges können drei unterschiedliche Parameter errechnet werden:

$$\text{- Trächtigkeitsrate (in \%): } \frac{\text{Trächtig gewordene Empfänger}}{\text{Gesamtzahl der Empfänger}} \times 100$$

$$\text{- Implantationsrate (in \%): } \frac{\text{Anzahl implantierter Embryonen}}{\text{Anzahl übertragener Embryonen}} \times 100$$

$$\text{- Überlebensrate (in \%): } \frac{\text{Anzahl geborener Jungtiere}}{\text{Anzahl übertragener Embryonen}} \times 100$$

Die Ermittlung der Implantationsrate erfolgte nach unterschiedlich langer Trächtigkeitsdauer. In Tabelle 6 ist dieser Zeitpunkt mit Kontrolltag aufgeführt. Sollten sowohl die Implantationsrate als auch die Überlebensrate bestimmt werden, wurden die Implantationen chirurgisch ermittelt (STAPLES, 1971; MEIER, 1972). Ansonsten wurden die Empfängertiere am Kontrolltag getötet (DAUZIER, 1962; TESTART, 1969). ROLOFF (1976) vermutete, daß der chirurgische Eingriff der Implantationskontrolle den weiteren Trächtigkeitsverlauf negativ beeinflußt. STAPLES (1971) hatte diesen Einfluß nicht festgestellt.

2.1.4 Faktoren, die das Transferergebnis beeinflussen

2.1.4.1 Embryonen

Die optimale Embryonenanzahl pro Uterushorn lag in Untersuchungen von STAPLES (1971) und MAURER et al. (1968b) bei fünf. Wurden zwischen 5 und 25 Embryonen pro Uterushorn übertragen, so wirkte sich dies nicht auf die Trächtigkeitsrate aus. Die Implantationsrate fiel dagegen von 82 % auf 42 %. Die beiden Uterushörner des Uterus bicornis waren voneinander unabhängig, d.h. die Embryonenanzahl in einem Uterushorn beeinflußte die Implantationsrate der anderen Seite nicht (ADAMS, 1962). Bei Übertragung von nur einem Embryo betrug die Trächtigkeitsrate 53 % gegenüber 70 % beim Transfer von 2 Embryonen. Bestand nur eine Implantation, so kam es in 20 % dieser Trächtigkeiten zur Geburt, während die Überlebensrate bei 2 Implantationen 87 % betrug. Daraus schloß ADAMS (1970a), daß 2 Implantate normalerweise genügen, um die Rückbildung der Corpora lutea am siebzehnten Tag der Trächtigkeit zu verhindern. Um das Überleben von ein oder zwei Versuchsembryonen bis zur Geburt zu sichern, empfahl ADAMS (1982b) die Übertragung von unbehandelten Embryonen in das gegenüberliegende Horn.

Tabelle 6: Transplantationsergebnisse

STADIUM bzw. ALTER TRANSFERIERTER EMBRYONEN	TRÄCHTIG- KEITSRATE %	IMPLANTATIONSRATE %	ÜBER- LEBENS- RATE Kontroll- tag %	AUTOREN
2 bis 4 Zeller 25 Std. p.c.*	91,6 - -	- 17,4 57,5	- 12 n.T.** 12 n.T.	54,4 - 38,8 CHANG (1948) GABLER (1970) MEIER (1972)
8 bis 16 Zeller	- -	10,0 54,6	12 n.T. 12 n.T.	- 37,9 GABLER (1970) MEIER (1972)
Morulae				
62-64 Std. p.c.	-	-	-	78 DOWLING (1949)
28-32 Std. p.c.	89,5	-	-	54,0 MAURER et al. (1970)
	-	3,8	12 n.T.	- GABLER (1970)
	-	40,0	12 n.T.	29,5 MEIER (1972)
Blastozysten				
72 Std. p.c.	45,5	-	-	31,1 CHANG (1948)
92 Std. p.c.	55,6	-	-	23,6 CHANG (1948)
4 1/2 Tage p.c.	84,6	46,6	12 n.T.	- DAUZIER (1962)
	-	54-60	9 p.c.	- HAFEZ (1962)
4 Tage p.c.	85,7-60,0	77,1-45,1	11 p.c.	- TESTART (1969)
	-	65,6	12 p.c.	37,0 STAPLES (1971)
	-	47,5	12 n.T.	32,1 MEIER (1972)
3 Tage p.c.	-	-	-	45,2 ROLOFF (1976)
4 Tage p.c.	-	-	-	39,2 ROLOFF (1976)
5 Tage p.c.	-	-	-	20,9 ROLOFF (1976)

* p.c. = nach Ovulationsauslösung

** n.T. = nach Transfer

Bezüglich des optimalen Entwicklungsstadiums der zu übertragenden Kaninchenembryonen stellte CHANG (1948) fest: "Je jünger die Embryonen sind, desto besser ist ihre Chance für eine normale Entwicklung." Die selbe Erfahrung machte GABLER (1970). Bei Embryonen der frühen Entwicklungsstadien fielen die Implantationsraten am besten aus. Auch MEIER (1972) beobachtete einen - wenn auch nicht statistisch signifikanten - Abfall der Entwicklungsfähigkeit transplanteder Embryonen mit zunehmendem Teilungsstadium.

2.1.4.2 Synchronität

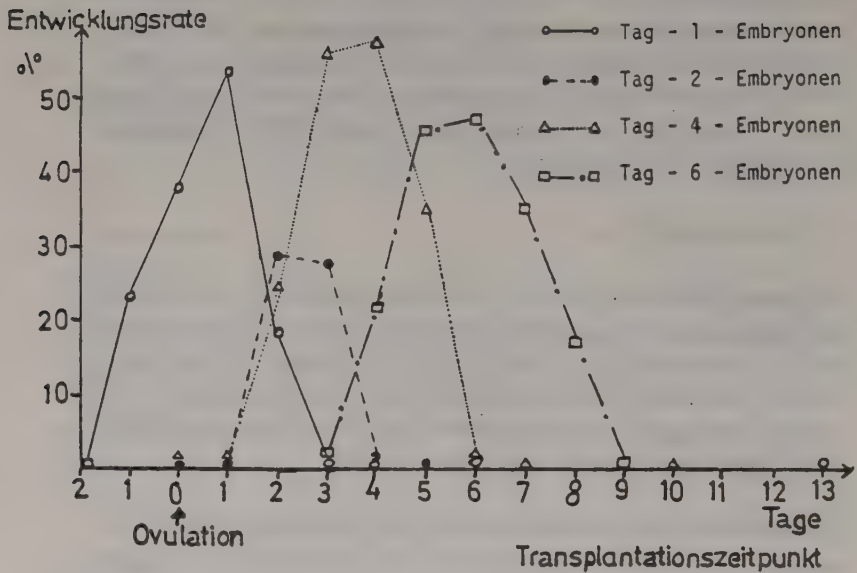
Als erster wies CHANG (1950) auf die Notwendigkeit hin, Spender- und Empfängerkaninchen zu synchronisieren. Dies erfolgte durch gleichzeitige Ovulationsinduktion (siehe 2.1.2.2) bei Spender- und Empfängertieren. Damit wurde die Anbildung der Corpora lutea ausgelöst, wodurch sich die Kaninchen im gleichen hormonellen Status befanden (CHANG, 1950; CHANG und PICKWORTH, 1969; ADAMS, 1982b).

Bei asynchronen Embryotransfers waren die Entwicklungschancen im allgemeinen für die Embryonen besser, wenn die Empfänger später als die Spender ovuliert hatten (CHANG, 1950; HAFEZ, 1962). Eine Übersicht über die Ergebnisse des asynchronen Embryotransfers von CHANG (1950) gibt Abbildung 1.

DOWLING (1949) ovulierte seine Empfängertiere 24 Stunden vor den Spendern und erhielt beim Transfer von Morulae 78 % lebende Jungtiere. YANG et al. (1985) stellten fest, daß bei Transfer in Empfängertiere 4 Tage nach der Ovulation ein halber Tag Asynchronität keinen Einfluß auf die Trächtigkeitsrate hat, und die Überlebensrate von 4 1/2 Tage alten Blastozysten in diesem Fall am höchsten liegt. Asynchronität von einem Tag war mit erfolgreichem Transfer in 3 oder 4 Tage nach der Ovulation befindlichen Uteri vereinbar. Lediglich der Transfer von 5 Tage alten Blastozysten führte infolge Schwierigkeiten bei der Handhabung nicht zum Erfolg (YANG et al., 1986).

Bei Transfer von längere Zeit in vitro kultivierten Embryonen war es günstig, die Empfänger später als die Spender zu ovulieren, um der verzögerten Entwicklung während der in vitro Kultur Rechnung zu tragen (GABLER, 1970; MAURER et al., 1970; ADAMS, 1971).

Abbildung 1: Asynchroner Embryotransfer (CHANG, 1950)



2.1.4.3 Empfänger

Als Empfänger in Embryotransferversuchen sollten nur gesunde Tiere mit guter Fruchtbarkeit eingesetzt werden (STAPLES, 1971; HAFEZ, 1971). Innerhalb des Fortpflanzungsgeschehens reagieren die keimbewahrenden Organe, Eileiter und Uterus, sensibler auf störende Einflüsse als das keimbereitende Ovar (HAHN und AEHNELT, 1972). Für die Auswahl geeigneter Empfängertiere spielen daher die im Folgenden aufgeführten Faktoren eine wichtige Rolle:

- Alter

Bei Kaninchen im Alter von über 3 Jahren schränkte die Uterusfunktion die Fruchtbarkeit ein. Die Ovarien dieser Tiere waren aber meist noch in der Lage, Eizellen zu produzieren, die sich zu Embryonen mit uneingeschränktem Entwicklungspotential umbilden konnten (ADAMS, 1965; MAURER und FOOTE, 1971). Ebenso konnten juvenile Tiere im Alter von 12 Wochen durch hormonelle Stimulation entwicklungsfähige Eizellen produzieren, waren aber noch nicht in der Lage, entwicklungsfähige Embryonen auszutragen (ADAMS, 1953).

- Rasse

Bezüglich der Rasse von Empfängertieren ermittelte MEIER (1972), daß bei Verwendung von Tieren aus fruchtbaren Zuchtlinien (in ihrem Fall F_1 -Kreuzungstiere: Schwarze Alaska x Weiße Neuseeländer) als Empfänger bessere Transplantationsergebnisse erzielt werden konnten.

- Anzahl der Corpora lutea

Für einen erfolgreichen Transfer von Kaninchenblastozysten forderte STAPLES (1971) mindestens 5 funktionstüchtige Corpora lutea. DAUZIER (1962) erzielte bessere Transplantationsergebnisse, wenn die Anzahl der Corpora lutea größer war als die Anzahl übertragener Embryonen. In der Präimplantationsphase hatte die Reduktion auf zwei Corpora lutea keinen Einfluß auf die Entwicklung der Embryonen bis zur Blastozyste (ADAMS, 1965b). Ebenso genügen 2 Corpora lutea vom achten Tag der Trächtigkeit an, um diese bis zur Geburt aufrecht zu erhalten (ADAMS, 1965a).

- Hormonstatus

Ein ausgewogener, der Trächtigkeit angemessener Hormonstatus des Empfängertieres ist für das Gelingen des Embryotransfers unerläßlich. GREENWALD (1957) erreichte durch Östrogengaben einen Abbruch der Trächtigkeit bei Kaninchen. Der hohe Östrogenspiegel führte in der frühen Trächtigkeit zur Reduzierung der Muzinschicht und in späterem Stadium zu Implantationsstörungen. Außerdem beschleunigten Östrogene den Eitransport (ADAMS, 1965a), wodurch sehr frühe Entwicklungsstadien in den Uterus gelangten. Während des lutealen Stadiums konnten sich im Uterus die frühen Teilungsstadien nicht entwickeln und degenerierten (CHANG, 1951). Oft wurden die frühen Entwicklungsstadien unter Östrogeneinfluß sogar durch den Uterus bis in die Vagina transportiert (ADAMS, 1965a; 1969). ADAMS (1980) beobachtete auch, daß 24 bis 36 Stunden alte Embryonen, die in synchrone Eileiter transplantiert wurden, ohne Östrogenapplikation in die Vagina ausgestoßen wurden und führte das auf hormonelle Imbalancen zurück.

SCHILLING und KÜMEL (1965) fanden, daß das genitale Milieu superovulierter Häsinnen die Embryonalentwicklung in der Präimplantationsphase hemmt.

- Umwelt

MEIER (1972) führte hohe postimplantatorische Verluste transplantiert-ter Embryonen zum Teil auf schlechte klimatische Bedingungen zurück, unter denen die Empfängerkaninchen gehalten wurden.

Da mehrere, zum Teil unspezifische Einflüsse die Trächtigkeit von Empfängerkaninchen bei Transferversuchen beeinflussen, haben AL-HASANI (1980) und STROJEK (1986) nur die tragenden Empfängerkaninchen berücksichtigt, um die Implantationsfähigkeit ihrer Versuchsembryonen zu beurteilen.

2.1.5 Embryo-Kultur

2.1.5.1 In vitro Kultur

Einer der ersten gut dokumentierten Berichte über Beobachtungen der Entwicklung von Kaninchenembryonen in vitro stammt von LEWIS und GREGORY (1929). Diese Autoren beobachteten mit einer Kamera, wie sich Ein- und Zweizeller, die maximal 2 Tage in Kultur am Leben blieben, zu Morulae entwickelten und gewannen Morulae zur Beobachtung ihrer Entwicklung bis zum achten Tag. Die Embryonen bildeten sich zu Blastozysten um und nahmen an Größe zu. Methodisch verwendeten LEWIS und GREGORY (1929) homologes oder autologes Blutplasma und kultivierten im hängenden Tropfen. PINCUS und WERTHESEN (1938) entwickelten drei verschiedene Kultursysteme, wobei sie die besten Ergebnisse mit einem Apparat erzielten, in dem das Medium zirkulierte und mit einem definierten Gasgemisch begast wurde.

In der weiteren Entwicklung der Embryokultur galt das Interesse der Untersuchung und Entwicklung geeigneter Kulturmedien. Neben dem Einsatz von homologen und heterologen Blutseren (zum Teil mit Zusätzen), welche brauchbare Ergebnisse bei der Kultur von Kaninchenembryonen vom Zweizeller bis zur Blastozyste lieferten (ONUMA et al., 1968; MAURER et al., 1970), kamen auch Mischungen einfacher Salzlösungen oder Zellkulturmedien mit Serum zum Einsatz. PURCHOTTAM und PINCUS (1961) verglichen verschiedene Medien und erhielten mit Eagle's Medium unter Zusatz von 10 % Serum die besten Entwicklungsergebnisse, während

keine Weiterentwicklung von Embryonen verschiedener Stadien in synthetischem, proteinfreiem Waymouthmedium und Krebs-Ringer-Bicarbonate mit 1 % Glucose und 2 % Albumin beobachtet wurde.

Bezüglich der Frage, ob Rinder- oder Kaninchenserum geeigneter für Kaninchenembryokultur ist, gab es unterschiedliche Ergebnisse. ONUMA et al. (1968) erzielten mit beiden Seren vergleichbare Kulturergebnisse und schlossen daraus, daß beide die notwendigen Inhaltsstoffe enthalten, die Kaninchenembryonen zur Entwicklung brauchen. GABLER (1970) stellte bei Verwendung von Rinderserum in Verbindung mit Gewebekulturmедien (Ham's F 10, TCM 199) deutlich herabgesetzte Ergebnisse gegenüber Kaninchenserum fest. Dagegen zeigte sich bei ABDEL-FATTAH (1979) der Zusatz von FKS (fetales Kälberserum) gegenüber Kaninchenserum zu BSM II (Basal synthetic Medium II) bei den Transplantationsergebnissen kultivierter Embryonen deutlich überlegen.

BRINSTER (1968) beschrieb die Kultur von Kanincheneinzellern bis zur Morula in einem völlig synthetischen Standardkulturmedium für Mäuseembryonen (BMOC₂ = Brinsters Mice Ova Culture Medium), in dem 1 mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin) $2,5 \times 10^{-4}$ molar Pyruvat und $2,5 \times 10^{-2}$ molar Laktat enthalten sind. KRISHNAN und DANIEL (1967) isolierten aus dem Uterussekret von graviden Kaninchen eine homogene Proteinkomponente, die sie "Blastokinin" nannten und die sie als essentiell für die Blastulation von Kaninchenembryonen ansahen. KANE und FOOTE (1970b) folgerten aus ihren Beobachtungen jedoch, daß dieses "Blastokinin" in vitro nicht für die Blastozystenbildung notwendig ist. KANE und FOOTE befaßten sich sehr intensiv mit der Entwicklung eines synthetischen Kaninchenembryonenkulturmediums und der Untersuchung der wirksamen Komponenten des Serumzusatzes zu den Zellkulturmedien (KANE und FOOTE, 1970a, b, c; 1971). Aus dem F 10 Medium von HAM (1963) entwickelten sie das BSM II, indem sie die Nucleinsäurevorstufen Hypoxanthin und Thymidin aus dem Ham's F 10 eliminierten (KANE und FOOTE, 1970b). Für die Kultur von Kaninchenzweizellern bis zur expandierten, geschlüpften Blastozyste setzten sie 1,5 % BSA zu.

Transferergebnisse von in vitro kultivierten Embryonen zeigten, daß die Entwicklungsfähigkeit mit der Kulturdauer abnimmt (ADAMS, 1970b; MAURER et al., 1970).

In Tabelle 7 sind die in der Literatur beschriebenen Kulturbedingungen für Kaninchenembryonen zusammengestellt.

Tabelle 7: Kulturbedingungen für Kaninchenembryonen

KULTURBEDINGUNGEN KRITERIUM	WERT	AUTOREN
pH-Wert	7,4	BRINSTER (1968), NAGLEE et al. (1968)
Osmolarität	250-290 m Osm	NAGLEE et al. (1968)
O ₂	10 %	DANIEL (1968)
CO ₂	5 %	NAGLEE et al. (1968)
Luftfeuchtigkeit	95-100 %	KANE und FOOTE (1970a)
Temperatur	37-38°C	ADAMS (1968)

2.1.5.2 In vivo Kultur

Embryonen können auch für einige Zeit in einem Zwischenempfängertier kultiviert, wiedergewonnen, beurteilt und anschließend auf einen endgültigen Empfänger übertragen werden. BOCHOW (1978) untersuchte die Kultur von Kaninchenembryonen in ligierten Eileitern von zyklussynchronen Kaninchen. Sie kam zu folgenden Ergebnissen:

- Mit steigender Kulturdauer kommt es zunehmend zu Degenerationserscheinungen. Verblieben die Embryonen über das Morulastadium hinaus im Eileiter synchroner Tiere, fiel die Ausbeute entwicklungsfähiger Embryonen stark ab.

- Die Entwicklung war im ligierten Eileiter ähnlich verzögert wie bei der in vitro Kultur.
- Es ergaben sich keine Vorteile gegenüber der in vitro Kultur, da sich das Verfahren der in vivo Kultur als ungleich aufwendiger erwies.

Bei Kultur von Embryonen in ligierten Eileitern von Kaninchen in der Follikelphase stellte BOCHOW (1978) keine Unterschiede gegenüber der Eileiterkultur in synchronen Tieren fest. Morulae, die in ligierten Eileitern von Kaninchen am 11. Tag der Pseudogravidität für 24 Stunden kultiviert wurden, entwickelten sich 56 % zu lebenden Jungen bei Retransfer auf synchrone Endempfänger (ADAMS, 1971).

Bei Kultur von Morulae in Uteri von Kaninchen zu verschiedenen Zeiten der Pseudogravidität (Tag 5, 7, 9, 11 p.c.) stellte ADAMS (1971) fest, daß die Entwicklungsfähigkeit beim Retransfer auf synchrone Empfänger nach Kultur in 9 und 11 Tage p.c. alten Uteri sehr stark abnahm.

2.2 GENTRANSFER

2.2.1 Methoden und Bedeutung der Erstellung transgener Säugetiere

2.2.1.1 Methoden

"Transgene Säugetiere" sind genetisch transformierte Säugetiere, das heißt, diese Tiere haben fremdes Genmaterial dauerhaft in ihr Genom integriert (GORDON und RUDDLE, 1981).

BREM (1986) stellte die Möglichkeiten zur Erstellung transgener Säugetiere, die am Versuchstier Maus entwickelt wurden, folgendermaßen zusammen:

- Injektion von Virus-DNA in Blastozysten und Zygoten und Infektion von präimplantären Embryonen mit Viren.
- Mikroinjektion von DNA in Pronuclei von Zygoten oder Nuclei von Embryonen.
- Erstellung von Chimären aus Embryonen und transgenen, totipotenten Zellen.

Auf eine weitere Möglichkeit, das Genom von Säugetieren anders als durch die konventionellen Methoden der Tierzucht zu beeinflussen, wiesen BRINSTER und PALMITER (1982) hin:

Durch den Austausch von Zygotenvorkernen mit Zellkernen von transgenen, totipotenten Zellen, nach der von ILLMENSEE und HOPPE (1981) beschriebenen Methode, können Tiere mit transformiertem Genom geschaffen werden.

2.2.1.2 Bedeutung und Anwendung

In der Literatur wurden in folgenden 3 Gebieten der Möglichkeit, fremde Gene ins Genom von Säugerorganismen zu integrieren, große Bedeutung zugemessen:

- Molekularbiologische Grundlagenforschung

BRINSTER und PALMITER (1982) sahen in der Möglichkeit, neue Gene ins

Genom von Versuchstieren einzuschleusen, ein neues Untersuchungsmodell, um den Effekt verschiedener DNA-Sequenz-Modifikationen auf die Expression von Genen im intakten Tier zu erforschen. Das Säugetier wurde auch von einigen anderen Autoren als hervorragendes in vivo Modell beschrieben, um Genfunktionen sowie Regulations- und Steuermechanismen der Genexpression im Ablauf der individuellen Entwicklung zu untersuchen. Die Entwicklung eines Säugerindividuums durchläuft von der Embryonalentwicklung über die Reifung zum geschlechtsreifen, erwachsenen Organismus bis hin zum Alterungsprozess eine Vielzahl unterschiedlicher Phasen. Dadurch kann die Funktion eines Gens im Säugerorganismus bei unterschiedlichen Rahmenbedingungen untersucht werden (GORDON und RUDDLE, 1981; E.F. WAGNER et al., 1981; MINTZ, 1983).

- Tierzucht

KRÄUBLICH (1986) diskutierte folgende Aspekte der Anwendung des Gentransfers in der Tierzucht:

- Gentechnische Manipulation von Leistungseigenschaften bei Nutztieren wie z.B. Körperwachstum und Laktation.
- Möglichkeiten, die Immunantwort und die Krankheitsresistenz bei Nutztieren positiv zu beeinflussen.
- Einführung von für die Tierzucht wichtigen Einzelgenen (wie z.B. das Streßresistenzgen des Schweines) in das Genom von Zuchttieren, ohne dabei auf die langwierigen Methoden der konventionellen Tierzucht wie Kreuzung und Selektion zurückgreifen zu müssen.
- Erforschung von Erbkrankheiten

MINTZ (1983) stellte als Anwendungsbeispiel des Gentransfers bei Mäusen die Möglichkeit der Erstellung von Tiermodellen menschlicher Erbkrankheiten dar. An Hand dieser Modelle könnten die Ätiologie dieser Krankheiten analysiert und mögliche Therapien entwickelt werden.

Bei der Einführung fremder Gene ins Genom von Säugetieren wurden bei allen Methoden primär 2 Ziele verfolgt und beurteilt:

- Integration der fremden DNA

Der Nachweis der Fremdgenintegration erfolgte hierbei durch DNA-Hybridisierungsuntersuchungen mit markierter Fremd-DNA. Es wurde zwischen der Integration des fremden Gens in das Genom aller Zellen und der Integration in nur einem Teil der Zellen eines Individuums bei genetischen Mosaiken und Chimären unterschieden. Eine große Bedeutung kam weiterhin der Keimbahnintegration zu, da dies die Voraussetzung für die Weitergabe des Fremdgens an die Nachkommen darstellt.

- Expression der fremden DNA

BRINSTER und PALMITER (1984) diskutierten 3 Fragestellungen zur Beurteilung der Expression von Fremdgenen. Sie diskutierten:

- ob ein integriertes Fremdgen überhaupt exprimiert wird,
- wie stark es exprimiert wird und
- in welchen Geweben es zur Expression kommt.

2.2.2 Virusvermittelter Gentransfer

DNA- und RNA-Tumroviren boten sich aus 2 Gründen als Vektoren zum Einbringen fremder DNA in tierische Zellen an:

- Es war viel über ihren Lebenszyklus bekannt und
- Tumroviren zeigen, wenn die Art der infizierten Zellen es erlaubt, die Eigenschaft, ihre DNA in diese Wirtszellen einzubauen (WATSON et al., 1986).

Das Affen-DNA-Virus, Simian Virus 40 (SV 40) und das zu den Retroviren gehörige Moloney murine Leukämia Virus (M-MuLV) wurden in weiteren Versuchen auch zur Einschleusung fremder DNA in das Genom von Mäusen verwendet. Prinzipiell wurden dabei 2 unterschiedliche Wege eingeschlagen:

- Infektion von präimplantären Embryonen

JAENISCH et al. (1975) infizierten Mäuseembryonen im Vier- bis Achtzellstadium mit M-MuLV. Dazu wurde die Zona pellucida mit dem Enzym Pronase abgedaut, und die Embryonen im Überstand M-MuLV infizierter

Zellkulturen kultiviert. Von 15 Jungtieren, die sich aus den infizierten, transferierten Mäuseembryonen entwickelten, zeigte eines eine für das M-MuLV typische Leukämie. Bei Hybridisierungsuntersuchungen der DNA aus 8 verschiedenen Geweben dieses Tieres mit viraler cDNA zeigte sich, daß in allen untersuchten Geweben die gleiche Anzahl von M-MuLV spezifischen DNA-Kopien integriert waren. Daraus schlossen JAENISCH et al. (1975), daß das Virus bei Infektion eines undifferenzierten Embryonalstadiums zur Integration in allen Körperzellen führt.

JAENISCH (1976) führte Anpaarungen virämischer Tiere aus infizierten Embryonen mit nicht infizierten Mäusen durch. Virämische männliche Nachkommen der F₁-Generation gaben bei Anpaarung an nicht infizierte Weibchen das Virämiemerkmal zu 50 % weiter. DNA-Untersuchungen zeigten, daß alle virämischen Nachkommen von Mäusen aus infizierten Embryonen genau eine Kopie des M-MuLV-Genoms pro diploiden Chromosomensatz besaßen. Daraus folgte, daß diese Nachkommenmäuse heterozygot auf einem einzigen Genlocus für das M-MuLV-Gen waren und JAENISCH (1976) hatte damit die Keimbahnintegration des M-MuLV ins Genom präimplantär infizierter Mäuseembryonen nachgewiesen. Durch Paarung zweier heterozygoter Tiere testete JAENISCH (1977) weiterhin die Vererbung des M-MuLV-Genes. Er fand dabei, daß Homozygotie auf dem M-MuLV-Locus mit normaler Entwicklung vereinbar ist.

BREINDL et al. (1979) wiesen nach, daß sich der Genlocus des M-MuLV (Mov-1-Locus) auf dem Chromosom 6 des Mäusegenoms befindet. In Weiterführung dieser Versuche infizierten JÄHNER und JAENISCH (1980) weitere Mäuseembryonen im Vier- bis Achtzellstadium durch Cokultur mit einer M-MuLV infizierten Zellkultur. Dadurch entstanden 3 neue Unterstämme von Mäusen, die unterschiedliche Genloci mit M-MuLV spezifische Sequenzen besaßen. Diese Genloci wurden mit Mov 2, Mov 3 und Mov 4 bezeichnet. Bei Untersuchung, in welchem dieser Mäuseunterstämme eine Virämie auftrat, stellte sich heraus, daß Mov 3-Mäuse spätestens im Alter von 3 Wochen eine starke Virämie entwickelten, während Mov 4-Mäuse überhaupt keine Virämie ausbildeten. JÄHNER und JAENISCH (1980) schlossen daraus, daß die Expression des M-MuLV vom Genlocus, auf dem es integriert ist, abhängig ist. JAENISCH et al. (1981) erstellten durch Modifikation des Infektionsvorganges bezüglich des Alters der infizierten Embryonen und Exposition mit virusausscheidenden Zelllinien 9 neue Mäuseunterstämme. Diese Mäuse hatten an unterschiedlichen Genloci das M-MuLV-Gen integriert (Mov 5 bis Mov 13). Infektiöses Virus wurde in der Mehrzahl der Unterlinien nicht

exprimiert. Nur 4 virusproduzierende Unterlinien (Mov 1, Mov 2, Mov 3, Mov 13) zeigten jeweils unterschiedliche Phänotypen der Virusexpression. JAENISCH et al. (1980) zogen daraus den Schluß, daß die chromosomale Region, in die das virale Genom eingebaut ist, die Expression des Gens während der Entwicklung beeinflußt.

Die oben beschriebenen Erkenntnisse des Einbaues von M-MuLV-Genen in Säugerorganismen wurden in weiteren Versuchen genutzt, um rekombinierte Gene ins Mäusegenom einzuschleusen. MANN et al. (1983) entwickelten mit gentechnischen Methoden eine Zelllinie, welche defektes, rekombiniertes Virusgenom in intakte Viruspartikel verpackt, ohne dazu Helferviren zu benötigen. Diese Viruspartikel mit dem defekten Genom können Wirtszellen infizieren und ihr Genom dort einbauen. Da das defekte Genom jedoch nicht mehr alle zur Expression von Viren nötigen Gensequenzen besitzt, entstehen in der Wirtszelle keine neuen Viruspartikel mehr. MANN et al. (1983) nannten diese Zelllinien Ψ -2-Verpackungszelllinien.

STUHLMANN et al. (1984) injizierten nun Zellen der Ψ -2-2-5 Zelllinie zusammen mit M-MuLV infizierten Zellen ins Blastozoeal von Mäuseembryonen und transferierten diese in Empfängermäuse. Die Ψ -2-2-5 Zelllinie verpackt das Genom des replikationsdefizienten murinen Sarkoma Virus, welches das Eco-gpt Markergen trägt (MSV-gpt). Durch die Injektion konnte die Inner-Cell-Mass der Embryonen mit MSV-gpt infiziert werden und das M-MuLV sollte die Ausbreitung dieser Vektoren fördern. Mehr als 50 % der geborenen Jungtiere zeigten eine M-MuLV-Virämie. Daneben exprimierten jedoch 25 % bis 30 % der Jungtiere das MSV-gpt-Genom in einer Vielzahl von Geweben. Dieses Ergebnis demonstrierte, daß retrovirale Vektoren zum Einbau fremder Gene in Säugetiere benutzt werden können. VAN DER PUTTEN et al. (1985) erstellten transgene Mäuse, indem sie Embryonen im Achtzellstadium mit abgedauter Zona pellucida auf Monolayer von Ψ -2-Zelllinien kultivierten und damit die Embryonen mit dem retroviralen, rekombinierten Genom, welches diese Zelllinie verpackte, infizierten.

- Injektion von Virus-DNA in Blastozysten und Zygoten

JAENISCH und MINTZ (1974) injizierten gereinigte SV 40-DNA in das Blastozoeal von Mäuseembryonen. 40 % dieser Blastozysten entwickelten sich nach Transfer in Empfängermäuse zu lebenden Jungtieren, die keine Tumoren ausbildeten. 40 % dieser Jungen zeigten bei DNA-Untersuchungen

in einigen Geweben die Integration von SV 40-Genomelementen. Diese Tiere hatten also die SV 40-DNA in einen Teil ihrer Körperzellen eingebaut und waren somit genetische Mosaik.

Aus dem Mov-3 Mäuseunterstamm, den JÄHNER und JAENISCH (1980) durch Infektion präimplantatorischer Embryonen erstellen konnten, isolierten HARBERS et al. (1981a) ein 16,8 kb langes Eco RI-Fragment, welches das M-MuLV-Genom und die flankierenden Mäusegenomsequenzen enthielt und vermehrte es im pBR322-Plasmid. HARBERS et al. (1981b) injizierten diese klonierte DNA ins Zytoplasma von Zygoten. Nach Transfer in Empfänger-mäuse erhielten sie Jungtiere, die eine einzige Kopie des Genfragments in jeder Körperzelle aufwiesen. Dasselbe DNA-Fragment benutzten C.L. STEWART et al. (1983) zur Injektion in den männlichen Vorkern von Mäusezygoten. Nach Transfer dieser Zygoten in Empfänger-mäuse entwickelte sich ein Jungtier, welches mehrere Kopien dieses Gens im Genom integriert hatte und diese an seine Nachkommen weitervererbte.

2.2.3 Gentransfer durch Erstellung von Chimären aus Embryonen und transgenen totipotenten Zellen

Totipotente Zellen sind Zellen, die sich zu jeder beliebigen Gewebezelle eines Organismus ausdifferenzieren können. Durch Injektion solcher totipotenter Zellen ins Blastozoe von Embryonen konnten Chimären erstellt werden, deren Körperzellen zu einem Teil von den Blastomeren und zum anderen Teil von den totipotenten Zellen abstammten. MINTZ (1979) sah in dieser Technik im Zusammenhang mit den molekulargenetischen Möglichkeiten, das Genom von Zellen in Kultur zu verändern, eine vielversprechende Möglichkeit, transgene Säugetiere zu erstellen. Als Vorteil dieser Gentransfermethode wurde beschrieben, daß vor dem Einbringen in den komplexen Säugerorganismus der Vorgang der Fremdgenintegration in den Zellen durch Selektion gesteuert werden kann (MINTZ, 1983; ROBERTSON et al., 1986).

2.2.3.1 Totipotente Zelllinien

Folgende 2 totipotente Zellarten wurden bei der Erstellung von chimären Mäusen verwendet.

- Teratokarzinomzellen

Teratome, tumorös entartete Embryonen, können entweder spontan entstehen oder durch ektopische Implantation ins Hodengewebe induziert werden. STEVENS (1970) implantierte Tag-3- bis Tag-6-Mäuseembryonen ins Hodengewebe von Mäuseböcken und erhielt Teratome, die von spontan auftretenden Teratomen nicht zu unterscheiden waren. Durch intraperitoneale Injektion solcher Teratome entstanden Ascitestumoren mit "embryoid bodys". Diese "embryoid bodys" bestehen aus einer "rind" aus Dottersackepithel und einem "core" aus undifferenzierten Embryonalzellen. Diese Teratokarzinomzellen können nur in vivo durch intraperitoneale Injektion in Wirtstiere kultiviert werden.

MINTZ und CRONMILLER (1981) etablierten eine in vitro kultivierbare Teratokarzinomstammzelllinie aus einem experimentell induzierten Teratokarzinom der Maus. Diese Zelllinie bezeichneten sie als "Mouse Euploid Totipotent Teratocarcinoma" (METT-1).

- Embryonale Stammzellen

EVANS und KAUFMANN (1981) entwickelten eine Methode, um totipotente murine Zellkulturlinien zu erstellen. Sie isolierten Zellen der Inner-Cell-Mass kultivierter Mäuseblastozysten und kultivierten diese totipotenten Zellen in vitro.

2.2.3.2 Chimären aus totipotenten Zellen und Embryonen

Die ersten Chimären aus Mäuseembryonen und totipotenten, murinen Teratokarzinomzellen erstellten MINTZ und ILLMENSEE (1975). Sie injizierten jeweils 5 Zellen aus dem "core" der "embryoid bodys" eines seit 8 Jahren in vivo als Ascitestumor kultivierten Teratokarzinoms ins Blastocoel von Mäuseembryonen. Nach Transfer dieser Blastozysten in Empfängeräuse wurden Chimären geboren, die in entwicklungsmäßig unabhängigen Geweben Zellen besaßen, die von den Teratokarzinomzellen abstammten. Auch die Integration von X/Y-Karzinomzellen in die Keimbahn mit der Entwicklung von funktionstüchtigen Spermien wurde beobachtet. ILLMENSEE und MINTZ (1976) wiesen die definitive Totipotenz dieser Teratokarzinomzellen nach, indem sie diese Chimären auch durch Injektion einer einzigen Teratokarzinomzelle erstellen konnten.

CRONMILLER und MINTZ (1978) untersuchten nun mehrere murine Teratokarzinomzelllinien im Hinblick auf die Erstellung von Mäusechimären. Es stellte sich heraus, daß nur Zelllinien mit intaktem Chromosomensatz dafür geeignet waren. Die in vitro kultivierbare METT-1-Zelllinie testeten T.A. STEWART und MINTZ (1981). Sie konnten Mäusechimären erstellen, die zum Teil das Teratokarzinomgenom an ihre Nachkommen weitergaben.

BRADLEY et al. (1984) injizierten die embryonalen Stammzellen von 3 unabhängig isolierten X/Y-Zelllinien in Mäuseblastozysten und erhielten nach Transfer Chimären. Einige dieser chimären Mäuseböcke hatten die embryonalen Stammzellen funktionell in die Keimbahn integriert.

2.2.3.3 Chimären mit transformierten, totipotenten Zellen

WATANABE et al. (1978) transferierten das mitochondriale Chloramphenicol-Resistenz-Gen (CAP^r) einer Melanomzelllinie in murine Teratokarzinomzellen und erstellten durch Selektion eine CAP^r -Hybrid-Zelllinie. Durch Injektion dieser Zellen in Blastozysten und Transfer auf Empfänger-mäuse entstanden Mäusechimären, die das CAP^r in einem Teil ihrer Gewebe exprimierten.

C.L. STEWART et al. (1985) transformierten sowohl Teratokarzinomzellen als auch embryonale Stammzellen durch Infektion mit transformierten retroviralen Vektoren. Mit diesen transformierten murinen Zelllinien, die das Neomycin-Resistenz-Gen (Neo-Gen) integriert hatten, erstellten sie Injektionschimären. Diese chimären Mäuse exprimierten das Neo-Gen in nahezu allen Geweben.

ROBERTSON et al. (1986) transformierten embryonale Stammzellen mit retroviralen Vektoren durch Infektion mit einer Ψ -2-Zelllinie. Die mit diesen Zellen erstellten Mäusechimären exprimierten das Fremdgen und gaben es zum Teil auch an ihre Nachkommen weiter.

2.2.4 Gentransfer durch DNA-Mikroinjektion in Zygotenvorkerne

2.2.4.1 Methode

LIN (1966) entwickelte eine Mikroinjektionsmethode um Flüssigkeiten in Zygoten von Mäusen zu injizieren. Mit einem solchen Mikroinjektions-

aufbau injizierten GORDON et al. (1980) ein suspendiertes, rekombiniertes Bakterienplasmid in einen der Vorkerne von Mäusezygoten und konnten als erste von der Erstellung transgener Mäuse durch DNA-Mikroinjektion berichten. Sie verwendeten das pST6-Plasmid. Dieser Abkömmling des bakteriellen pBR322-Plasmids trug die Regulator- und Promotorsequenzen des SV 40 und das Strukturgen der Thymidinkinase (TK) des Herpes simplex Virus. GORDON et al. (1980) fixierten den Mäuseembryo an einer Haltepipette und injizierten ca. 1 μ l Plasmidsuspension in einen der beiden Vorkerne. Embryonen, die diese Mikromanipulation überlebten, wurden in Empfänger-mäuse transferiert. 2 von 78 geborenen Jungtieren zeigten bei Southern-blot-Untersuchungen ihrer DNA die Integration des fremden Gens. GORDON und RUDDLE (1981) wiesen die Weitergabe des Fremdgens dieser Mäuse an ihre Nachkommen und damit die Keimbahnintegration der Fremd-DNA nach.

Es folgten weitere Berichte über die Erstellung transgener Mäuse durch DNA-Mikroinjektion in Pronuclei von Zygoten:

E.F. WAGNER et al. (1981) injizierten ein rekombiniertes Plasmid mit 2 exogenen Genen, dem Herpes-simplex-TK-Gen und dem menschlichen Erwachsenen- β -Globulin-Gen, in Mäusevorkerne. Von den daraus erstellten Mäusen zeigten 5 Tiere (15 %) die Integration des Fremdgens und 1 Tier davon exprimierte das TK-Enzym.

T.E. WAGNER et al. (1981) sowie CONSTANTINI und LACY (1981) verwendeten nicht nur ein Plasmid, sondern auch lineare Genfragmente zur Mikroinjektion. Bei resultierenden, transgenen Mäusen konnten Expression und Keimbahnintegration des injizierten Kaninchen- β -Globulin-Gens nachgewiesen werden.

In der Folge dieser ersten Arbeiten wurden eine Vielzahl von Genkonstrukten in die Vorkerne von Mäusezygoten eingebracht und transgene Mäuselinien erstellt. STROJEK (1986) erarbeitete eine Übersicht über diese Arbeiten mit Angaben der integrierten Genkonstrukte und der Effektivitätsraten.

BRINSTER et al. (1985) untersuchten systematisch den Einfluß folgender Faktoren auf die Integrationsrate von fremder DNA in Mäuseembryonen:

- Konzentration der injizierten DNA-Lösung

Mit steigender Konzentration der mikroinjizierten DNA-Lösung stieg auch die Integrationsrate der Fremdgene, während die Überlebensrate der manipulierten Mäuseembryonen abnahm.

- Form der Fremdgenpräparation

Lineare DNA-Fragmente wurden deutlich häufiger in das Genom integriert als die DNA zirkulärer Plasmide.

- Ort der DNA-Injektion

Nach intrazytoplasmatischer DNA-Injektion erfolgte viel seltener eine Integration in das Genom der Zygote als nach intrapronuclearer Injektion. Die Injektion in den größeren, männlichen Vorkern erbrachte geringgradig bessere Ergebnisse als die Injektion in den weiblichen Vorkern.

- Zuchtlinie der Versuchsmäuse

Die Integrationsergebnisse waren bei Verwendung von Hybridmäusen deutlich besser als beim Einsatz von Mäusen eines Inzuchtstammes.

Die optimalen Bedingungen für die Integration eines Fremdgens ergaben sich bei der Injektion von ein paar hundert Kopien eines linearen DNA-Fragments in den männlichen Vorkern von Hybridmäusezygoten.

2.2.4.2 Der Metallothionein-Promotor

Die Expression von Strukturgenen wird von "cis-aktiven" DNA-Sequenzen, die mit dem Strukturgen auf einem Chromosom lokalisiert sind, und von "trans-aktiven" DNA-Sequenzen auf anderen Chromosomen gesteuert. Promotoren sind "cis-aktive" Gensequenzen, die die Transkription eines Gens regulieren. Fusionsgene, die in die Vorkerne von Mäusezygoten injiziert wurden, besaßen neben dem Strukturgen, welches für ein Proteinmolekül codiert, auch Promotorsequenzen. Der Promotor, welcher die Expression des Metallothionein I der Maus (mMT_1) steuert, wurde häufig bei der Erstellung von Fusionsgenen benutzt.

Metallothioneine sind Proteine, deren physiologische Aufgabe es ist, Schwermetallionen wie Cadmium und Quecksilber zu binden um den Körper vor einer Vergiftung zu schützen, sowie bestimmte Enzyme mit Zink- und Kupferionen zu versorgen (WATSON et al., 1986). Die Freisetzung dieser Proteine vor allem in Leber und Niere, aber auch in anderen Geweben, wird bei der Maus durch Glucocorticoide (z.B. Dexamethason) (HAGER und PALMITER, 1981) oder durch Schwermetallionen (z.B. Cadmium oder Zink) (DURNAM und PALMITER, 1981) induziert.

BRINSTER et al. (1982) injizierten das pMK-Plasmid, welches das TK-Strukturgen des Herpes simplex Virus und den mMT₁-Promotor trug, in die Vorkerne von Mäusezygoten. Nach Zugabe von Cadmiumionen zum Kulturmedium dieser Mäuseembryonen, konnte aktive virale TK in den Embryonen nachgewiesen werden.

BRINSTER et al. (1981) und PALMITER et al. (1982a) erstellten transgene Mäuse durch Mikroinjektion des pMK-Plasmids. Von den geborenen Jungtieren hatten 10 % bis 15 % das fremde Gen im Genom integriert. Einige dieser transgenen Mäuse exprimierten die virale TK entsprechend dem Verteilungsmuster nach dem das mäuseeigene MT₁-Gen exprimiert wird. Die Expression konnte durch Cadmium und Zink, nicht aber durch Glucocorticoide gesteigert werden. In Züchtungsexperimenten mit diesen pMK-transgenen Mäusen fanden PALMITER et al. (1982a), daß sich die Expressionsintensität des viralen TK-Gens bei den Nachkommen gegenüber der Elterngeneration verändert hatte. Offensichtlich hatten sich die Gene bei der Weitergabe über die Keimbahn verändert.

Weiterhin erstellten PALMITER et al. (1982b) ein lineares Fusionsgen, welches den mMT₁-Promotor mit dem Strukturgen des Wachstumshormons der Ratte (rGH) verband. Transgene Mäuse aus Mikroinjektion dieses Fusionsgens exprimierten das Wachstumshormon, wie erwartet, hauptsächlich in der Leber. Die Expression konnte durch Zink und Cadmium gesteigert werden.

LOW et al. (1985) stellte bei transgenen Mäusen, die das Somatostatinstrukturgen mit dem mMT₁-Promotor integriert hatten, die Expression von Somatostatin in der Hypophyse fest. Bei weiteren Untersuchungen dieser unerwarteten Expression und bei Untersuchungen der Expression bei transgenen Mäusen, die das humane Wachstumshormongen mit dem mMT₁-Promotor integriert hatten, stellten LOW et al. (1986) fest, daß

die mMT_1 -Fusionsgene nur in den gonadotropen Zellen der Hypophyse exprimiert wurden. Sie führten diese Expression auf die Beeinflussung des mMT_1 -Promotors durch "trans-aktive" Faktoren zurück.

2.2.4.3 Genkonstrukte, die das Wachstum beeinflussen

Das Wachstum von Säugetieren wird vom Wachstumshormon (GH) gesteuert. Die Freisetzung dieses Hormons wird durch den Wachstumshormon-Releasingfaktor (GRF) und das Somatostatin reguliert. GRF fördert die Ausschüttung von GH, Somatostatin hemmt sie.

PALMITER et al. (1982b) injizierten das rekombinierte DNA-Fragment mMT_1 -rGH in Pronuclei von Mäusezygoten. Von 21 Jungtieren, die sich aus diesen Zygoten entwickelten, trugen 7 das fremde Gen im Genom, und bei 6 dieser transgenen Mäuse konnte rGH im Serum nachgewiesen werden. Die Mäuse, die das rGH exprimierten, wuchsen schneller und zu größeren Individuen als ihre Wurfgeschwister. PALMITER et al. (1983) konnte den selben Effekt mit dem mMT_1 -hGH-Genkonstrukt erreichen, welches das Strukturgen für das menschliche Wachstumshormon trug. HAMMER et al. (1984) fanden, daß weibliche Tiere, die das rGH oder hGH exprimierten, im allgemeinen unfruchtbar waren. Die Ursache dafür wurde nicht geklärt.

Um die physiologischen Konsequenzen der GRF-Expression zu untersuchen, erstellten HAMMER et al. (1985a) transgene Mäuselinien mit dem mMT_1 -GRF-Fusionsgen. Transgene Tiere dieser Linien, die das GRF exprimierten, zeigten hohe GH-Werte im Plasma, wuchsen schneller als ihre Wurfgeschwister und zeigten hyperplastische Hypophysen. Erstaunlicherweise waren die weiblichen Tiere fertil.

Das Wachstum von transgenen Mäusen, die das rekombinierte mMT_1 -Somatostatin-Gen exprimierten, war nicht beeinträchtigt (LOW et al., 1985).

2.2.5 Gentransfer durch DNA-Mikroinjektion beim Kaninchen

Die ersten Berichte der Erstellung transgener Kaninchen stammten von HAMMER et al. (1985 b) und BREM et al. (1985). Beide Arbeitsgruppen übertrugen die Mikroinjektionsmethode von der Maus auf das Kaninchen und injizierten das mMT_1 -hGH in einen der bei Kaninchenzygoten gut

sichtbaren Vorkerne. Die nach Transfer auf Empfänger erhaltenen Jungtiere hatten zu 12,8 % (HAMMER et al., 1985b) und 17,6 % (BREM et al., 1985) das mMT₁-hGH-Gen im Genom integriert. HAMMER et al. (1985b) konnten außerdem die Expression des Fremdgens nachweisen.

STROJEK (1986) berichtete von der Injektion des Uteroglobulin-Promotor-CAT-Fusionsgens in Kaninchenzygoten. Ziel dieser Arbeit war es, transgene Kaninchen zu erstellen, um die Expression der Uteroglobulin-Promotorsequenzen in weiteren Arbeiten zu untersuchen. Uteroglobulin spielt nach derzeitigen Kenntnissen eine wichtige Rolle bei der Implantation von Kaninchenembryonen. STROJEK (1986) injizierte 1000-5000 Kopien des Fremdgens in Form ganzer Vektorplasmide oder als 2,9 kb lange, lineare DNA-Fragmente in den männlichen Vorkern von Kaninchenzygoten. 9,5 % der mikroinjizierten Zygoten entwickelten sich zu Jungtieren. Von den bisher untersuchten 17 Kaninchen hatten 7 (41 %) Fremdgensequenzen in ihr Genom integriert.

BÜHLER et al. (1987) injizierte zwischen 100 und 4000 Kopien des pR-HL_{TPN}-Plasmids in den männlichen Vorkern von Kaninchenzygoten. Das Plasmid trug 2 murine Gene, die für ein spezifisches Immunglobulin M (IgM) codieren. Nach Transfer der mikroinjizierten Zygoten entwickelten sich Jungtiere, die aber noch nicht auf Integration oder Expression untersucht worden sind.

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse dieser ersten Arbeiten über den Gentransfer beim Kaninchen aufgelistet. Folgende 4 Kriterien wurden zum Vergleich der Ergebnisse gegenüber gestellt:

- Degenerationsrate (in %):
$$\frac{\text{Gesamtzahl mikroinjizierter Embryonen}}{\text{Anzahl degenerierter Embryonen}} \times 100$$
- Trächtigkeitsrate (in %):
$$\frac{\text{Trächtig gewordene Empfänger}}{\text{Gesamtzahl Empfänger}} \times 100$$
- Überlebensrate (in %):
$$\frac{\text{Anzahl geborener Jungtiere}}{\text{Anzahl übertragener manipulierter Embryonen}} \times 100$$

Anzahl transgener Kaninchen

$$\text{- Integrationsrate (in \%): } \frac{\text{Anzahl transgener Kaninchen}}{\text{Anzahl untersuchter Kaninchen}} \times 100$$

Die Degenerationsrate wurde meist direkt vor dem Transfer der manipulierten Zygoten, ca. 2 Stunden nach der Mikroinjektion, bestimmt. Zur Beurteilung der Trächtigkeitsrate bestimmte STROJEK (1986) die Trächtigkeit durch operative Implantationskontrolle. Bei allen anderen Arbeiten wurde eine Häsin als trächtig beurteilt, wenn sie zur Geburt kam.

Tabelle 8: Ergebnisse bei der Erstellung transgener Kaninchen

FREMD- GENE	DEGENE- RATIONS- RATE	TRÄCHTIGKEITS- RATE Geburt	Implan- tation	ÜBER- LEBENS- RATE	INTE- GRATIONS- RATE	AUTOREN
	%	%	%	%	%	
mMT ₁ - hGH	-	-	-	11,4	12,8	HAMMER et al. (1985b)
mMT ₁ - hGH	10	26	-	9,6	18	BREM et al. (1986)
Utero- globin- CAT	6	39	73	9,5	41	STROJEK (1986)
Mäuse IgM	-	33	-	8,1	-	BÜHLER et al. (1987)

3. MATERIAL UND METHODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Tiere

Da keine eigene Zuchtpopulation zur Verfügung stand, wurden die Kaninchen in unterschiedlichen Betrieben zugekauft. Insgesamt standen 195 weibliche Kaninchen für die Versuche zur Verfügung. Die Rasse, die Herkunft und das Alter dieser Tiere setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 140 Kreuzungstiere aus großen und mittelgroßen Kaninchenrassen von 2 verschiedenen Züchtern und unbestimmtem Alter.
- 7 Kreuzungstiere aus kleinen und mittelgroßen Kaninchenrassen von einem landwirtschaftlichen Betrieb im Alter von 5 bis 6 Monaten.
- 30 ZIKAR^R-Masthybriden (Basiszucht: Dr. Erich Zimmermann) aus 2 Vermehrungszuchtbetrieben im Alter von mindestens 16 Wochen.
- 18 Kaninchen sonstiger Rassen, hauptsächlich rote und weiße Neuseeländer, aber auch Rexkaninchen, blaue und weiße Wiener und Kalifornier. Die Tiere dieser Gruppe waren von unterschiedlichem Alter und verschiedenen Herkünften.

168 Kaninchen waren Embryonenspender. Tiere aus in vivo Spülungen wurden zweimal zur Embryogewinnung herangezogen. Die zweite Spülung erfolgte hierbei ebenso wie bei ehemaligen Empfängertieren nach Schlachttötung.

73 meist virgine Kaninchen, die vorher noch nie im Versuch waren, wurden als Empfänger eingesetzt. Bezüglich der Vorbehandlung konnten folgende Voraussetzungen unterschieden werden:

- keine Vorbehandlung.
- Eingewöhnungszeit mindestens 3 Wochen und eine erste HCG-Applikation 21 Tage vor dem Versuchseinsatz.

Zur Belegung der weiblichen Kaninchen und zur Spermagewinnung standen ständig mindestens 6 fertile Rammeler zur Verfügung. Es handelte sich um Kreuzungstiere aus großen und mittelgroßen Kaninchenrassen sowie um einen Kalifornierrammeler.

Die Haltung der Kaninchen erfolgte in einem Versuchsstall bei einem Lichtprogramm mit zehnstündigem Lichttag. Der Raum war beheizbar und wurde künstlich belüftet. Die Stalltemperatur lag bei 17° C. Die Tiere wurden in Einzelkäfigen (Grundfläche: 70 x 60 cm) gehalten. Einige Tage vor der Geburt bekamen die trächtigen Häsinnen einen mit Stroh eingestreuten Holznistkasten (Grundfläche: 70 x 30 cm) in den Käfig gestellt.

Die Kaninchen erhielten täglich eine Ration von 75g Kaninchenzuchtfutter in Pelletform mit:

- 16 % Rohprotein
- 16 % Rohfaser
- 2 % Rohfett
- 9 % Rohasche
- und Vitaminen A, D₃, E.

Heu und Wasser standen ad libitum zur Verfügung. Laktierende Häsinnen bekamen unbegrenzt Zuchtfutter.

3.1.2 Genkonstrukte

Die im folgenden aufgeführten Genkonstrukte wurden in die Vorkerne von Kaninchenzygoten injiziert. Es handelt sich in allen Fällen um lineare DNA-Fragmente. Die Länge dieser Fragmente, die Konzentration und die Anzahl der Genkopien in den jeweiligen DNA-Lösungen sind in Tabelle 9 zusammengefaßt. Es wurden unterschiedliche Konstrukte eingesetzt, um eventuelle genabhängige Einflüsse bei der Mikroinjektion von klonierten Genen beim Kaninchen zu untersuchen.

3.1.2.1 Wachstumshormon-Gen (mMT₁-hGH)

mMT₁-hGH (mouse metallothionein I-human growth hormone gene) besteht aus dem Strukturgen des menschlichen Wachstumshormons und dem Promotor

des Metallothioneingenes I der Maus. Das Strukturgen enthält neben der Codierung für das Wachstumshormon auch alle für die Transkription von eukaryontischen Genen notwendigen DNA-Sequenzen. Dieses Konstrukt dient dazu, die Integration des Wachstumshormongens im Genom von Kaninchen und dessen Expression durch einen fremden Promotor zu untersuchen. In Abbildung 2 sind das Vektorplasmid und das lineare DNA-Fragment dargestellt.

3.1.2.2 Tryptophan Oxygenase Promotor (TO-CAT)

Im TO-CAT (tryptophan oxygenase-chloramphenicol acetyl transferase gene) ist der Promotor des Tryptophan Oxygenase Gens an die DNA-Sequenzen, die das Bakterienenzym Chloramphenicol-acetyltransferase codieren, rekombiniert. Die für die Transkription dieses Gens notwendigen Basensequenzen stammen aus dem Genom des SV 40-Virus. Dieses Genkonstrukt wurde eingesetzt, um festzustellen, in welchem Gewebe der Tryptophan Oxygenase Promotor das ihm folgende Strukturgen zur Expression bringt. Als Strukturgen wurde das CAT-Gen gewählt, da es in eukaryontischen Zellen natürlicherweise nicht vorkommt und als Marker in einem CAT-Assay nachgewiesen werden kann (RENKAWITZ, 1986).

3.1.2.3 Mx-Protein Gen (hMT II_A-Mx)

hMT II_A-Mx (human metallothionein II - Mx-protein gene) besitzt als Strukturgen das Mx-Protein Gen der Maus, dem der Promotor des menschlichen Metallothionein Gens II vorgeschaltet ist. Weitere für die Transkription notwendigen DNA-Sequenzen stammen hier vom β -Globulingen der Maus. Das Mx-Proteingen kommt in der Natur bei einigen Mäusestämmen vor. Das von ihm codierte Mx-Protein hemmt die Replikation von Orthomyxoviren. Mx⁺-Mäusestämmen, in deren Genom sich ein intaktes Mx-Protein Gen befindet, sind influenzaresistent, während Mx⁻-Mäusestämmen nicht resistent sind (STAEHEL et al., 1986).

3.1.2.4 Wachstumshormon-Releasingfaktor-Gen (mMT₁-GRF)

Die funktionellen Bereiche des mMT₁-GRF (mouse metallothionein-growth hormone releasingfaktor gene) bestehen aus der cDNA des Wachstumshormon-Releasingfaktorgens und dem Promotor für das Metallothionein I der Maus. Weitere für die zur Transkription notwendigen DNA-Sequenzen stammen bei diesem Konstrukt aus dem Genom des SV-40-Virus.

Abbildung 2: mMT₁-hGH (BRENIG; 1987)

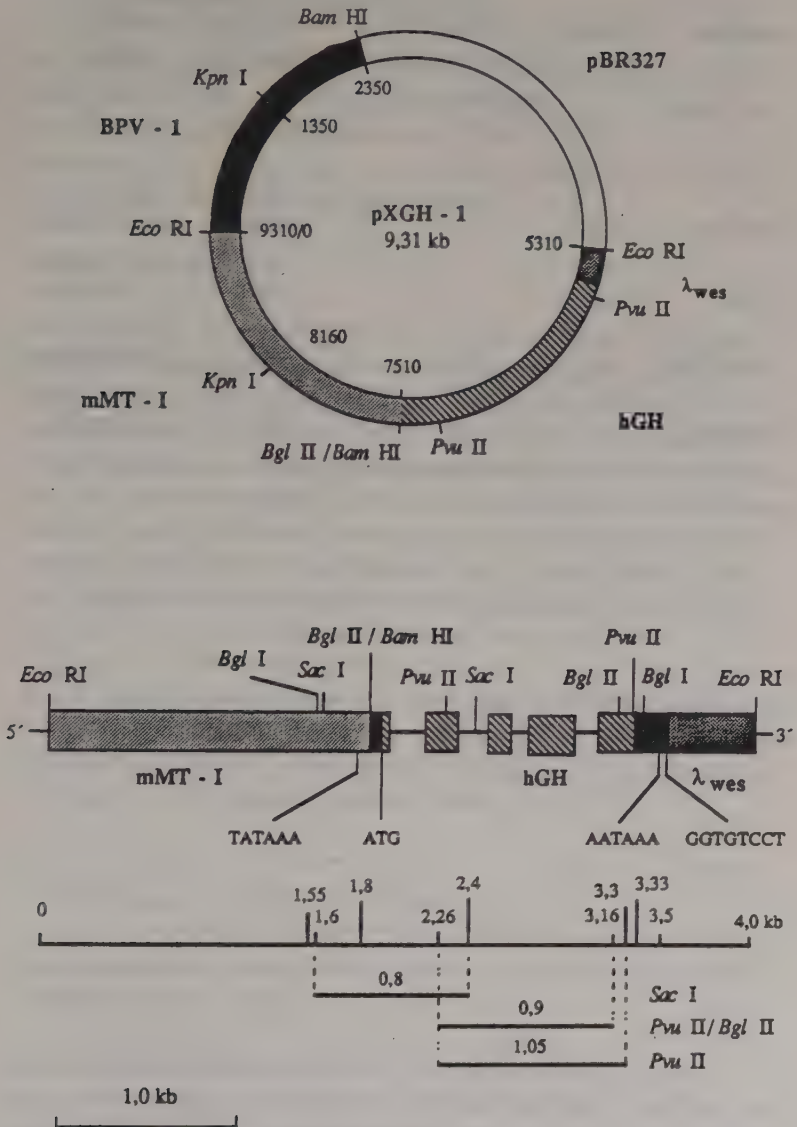


Tabelle 9: Eigenschaften der DNA-Injektionslösungen

KONSTRUKT	LÄNGE	KONZENTRATION DER INJEKTIONS- LÖSUNG	ANZAHL DER GENKOPIEN	KLONIERT VON
	in kb	µg/ml	ca. pro pl	
mMT ₁ -hGH	4,0	4	1000	H.M. Goodman
TO-CAT	3,7	1	300	R. Renkawitz
hMT II _A -Mx	5,1	10	3000	Ch. Weissmann
mMT ₁ -GRF	3,0	7	2000	B. Brenig

3.2 METHODE

3.2.1 Superovulation und Ovulationsauslösung

Die Spendertiere wurden mit einer einmaligen subcutanen Injektion von 20 bis 50 I.E. PMSG pro kg Körpergewicht superovuliert. Es kamen zwei unterschiedliche Präparate zum Einsatz:

-Intergonan^R (Vemí, Veterinär Chemie GmbH)

-Seragon^R (Ferring GmbH)

Drei Tage nach der PMSG-Injektion wurden 153 der Spender mindestens zweimal hintereinander im natürlichen Deckakt belegt. Weitere 17 Spendertiere wurden zweimal mit 2 bis 3 ml Frischsperma besamt. Die Spermagewinnung erfolgte mit der von GROVE (1963) beschriebenen künstlichen Vagina für Kaninchen. Reichte das Ejakulat eines Rammiers nicht aus, so wurden die Häsinnen zum Teil auch mit Mischsperma verschiedener Rammler besamt. Die Besamung wurde mit einer Plastikseminette für Rinder durchgeführt. In einem Zeitraum von ca. einer Stunde vor bis drei Stunden nach der Belegung erhielten die Spender 90 I.E. HCG (Ekluton^R, Fa. Vemí) intravenös zur Synchronisation.

Bei 52 Empfängertieren wurde zur gleichen Zeit wie bei den Spendern die Ovulation mit 90 I.E. HCG ausgelöst. 21 Empfänger erhielten eine höhere HCG-Dosis von 120 I.E., da sie bereits 21 Tage vorher zur Stimulation der Ovarien mit HCG behandelt worden waren.

3.2.2 Embryogewinnung und -beurteilung

Die Gewinnung von Zygoten mit sichtbaren Vorkernen erfolgte 17 bis 22 Stunden nach der Belegung.

Bei 141 Spenderkaninchen wurden die Zygoten nach Betäubung und Schlachttötung gewonnen. Die beiden Uterushornspitzen mit den Ovarien und Tuben wurden ca. 1 cm kaudal des Ostium uterinum tubae vom übrigen Uterus abgesetzt und dem Schlachtkörper entnommen. Nach sorgfältiger Entfernung der Mesosalpinx wurde die Tuba gestreckt und das Infundibulum tubae in eine kleine Plastikpetrischale (Durchmesser: 35 mm)

gelegt. Mit einer stumpfgeschliffenen Kanüle (Nr.1: 0,9 x 40 mm) wurde vom Uterus her durch das Ostium uterinum tubae in den Endteil der Tuba eingegangen. Die Spülung erfolgte nun in Richtung auf das Infundibulum tubae mit ca. 5 ml Spülmedium (PBS mit 1 % FKS) durch eine auf die Spülkanüle aufgesetzte 20-ml-Spritze.

Bei den restlichen 27 Spendern wurden die Zygoten in vivo durch Operation in Vollnarkose gewonnen.

Ca. 12 Stunden vor diesem operativen Eingriff bekamen die Tiere kein Futter mehr. Die Narkotisierung erfolgte durch eine subcutane Injektion von 0,2 ml 2 %igem Rompun^R (Fa.Bayer) pro kg Körpergewicht in einer Mischspritze zusammen mit 1 ml 5 %iger Ketaminlösung pro kg Körpergewicht. Die Prämedikation bestand in der subcutanen Applikation von 0,4 ml 0,1 %iger Atropinlösung ca. 10 Minuten vor der Narkotikainjektion.

Das Tier wurde im kaudalen Abdominalbereich geschoren und ca. 2 cm rechts und links der Medianen vom kaudalsten Zitzenpaar bis ca. 2 cm kranial über den Nabel hinaus rasiert. Nach dem Ausbinden des Kaninchens auf dem Operationstisch wurde das Operationsfeld mit Kodan^R-Spray desinfiziert. Zur sterilen Abdeckung wurde ein Plastikoperationstuch (60 x 90 cm) mit Liquidoplast^R-Spray und 2 Tuchklemmen fixiert. Um zu vermeiden, daß Darmteile aus der Operationswunde vorfallen und um die Vorlagerung des Uterus zu erleichtern, erfolgte eine Schrägstellung des Operationstisches, so daß der Kopf des Kaninchens nach unten zu liegen kam.

Der Zugang erfolgte median in der Linea alba. Der Schnitt erstreckte sich von ca. 1 cm kranial des letzten Zitzenpaares bis zum Nabel. Eine Uterushornspitze mit zugehörigem Eileiter und Ovar wurden aus der Bauchhöhle vorgelagert. Ein vorne rund gebogenes, 20 µl fassendes Transferpettorcap wurde durch das Infundibulum in die Ampulla tubae eingeführt und von einem Assistenten zwischen Daumen und Zeigefinger fixiert. Nun wurde mit einer dünnen Knopfkanüle (0,6 x 30 mm) die Uteruswand perforiert und durch das Ostium uterinum tubae in den Eileiter eingegangen. Mit ca. 10 ml Spülflüssigkeit erfolgte anschließend die Spülung in Richtung auf das Transferpettorcap. Die Spülflüssigkeit wurde in einer großen Plastikpetrischale (Durchmesser: 90 mm) aufgefangen. Nach dem Zurückverlagern des einen Uterushornes wurde der zweite Eileiter in gleicher Weise gespült.

Der Verschluß der Bauchhöhle erfolgte in 3 Schichten. Das Peritoneum und die Muskulatur wurden mit Catgut (3,5 metric) in U-Heften verschlossen. Es folgte eine fortlaufende Subcutannaht ebenfalls mit Catgut und die Hautnaht in U-Heften mit Supramid^R (Stärke: 0,30 mm). Damit das Kaninchen die Naht nicht gleich wieder aufbeißen konnte, wurde mit 3 Heften eine Tupferrolle von ca. 1 cm Durchmesser auf die Wunde genäht.

An die Operation schloß sich eine dreitägige systemische Antibiotikaversorgung an. Die Tupferrolle wurde nach 8 Tagen entfernt. Das Ziehen der Hautfäden erfolgte 14 Tage nach der Operation.

Die Zygoten wurden anschließend mit einem Transferpettor bei ca. 40-facher Vergrößerung unter einem Stereomikroskop Wild M 8 aus den Auffangpetrischalen herausgesucht und in einen Mediumtropfen (PBS mit 20 % FKS) unter Paraffinölabdeckung (Paraffinum subliquidum DAB 7) umgesetzt. Um das Auffinden der Zygoten zu erleichtern, wurde vor der Spülung ein Raster auf den Boden der Petrischalen aufgezeichnet.

Befanden sich die Zygoten noch im Cumulus oophorus und war dieser mechanisch nicht zu entfernen, wurde dem Mediumtropfen 1 µl einer $22,2 \times 10^4$ I.E. pro ml enthaltenden Hyaluronidase-Lösung zugesetzt und die Zygoten durch mehrmaliges Umsetzen in frische Mediumtropfen gewaschen.

Anschließend wurden die Embryonen in den Mediumtropfen unter einem Zeiss Inversmikroskop ICM 405 bei 400-facher Vergrößerung nach folgenden Kriterien beurteilt:

- Morphologie: Beschaffenheit der Membranen, Granula und der Muzinschicht sowie die Größe des perivitellinen Raums.
- Vorhandensein von Spermien im perivitellinen Raum.
- Vorhandensein des zweiten Polkörperchens.
- Vorhandensein von sichtbaren Vorkernen.

Eizellen, die weder Spermien im perivitellinen Raum aufwiesen noch

das zweite Polkörperchen und sichtbare Vorkerne zeigten, wurden als unbefruchtet klassifiziert. Morphologisch intakte Zygoten mit sichtbaren Vorkernen wurden zur DNA-Mikroinjektion verwendet.

3.2.3 Mikroinjektion von DNA

Zur Mikroinjektion wurden die Zygoten in einen großen Mediumtropfen auf einen Objektträger umgesetzt. Die Injektion erfolgte auf einem Zeiss Inversmikroskop IMC 405 bei 400-facher Vergrößerung. Es wurden 2 Leitz-Mikromanipulatoren verwendet. Am linken Manipulator befand sich die Haltepipette (Außendurchmesser 150 μm), an der die Zygoten durch Unterdruck fixiert wurden. Der rechte Manipulator war mit einem Piezostepper PM 20 N (Fa. Bachofer) ausgestattet, in den die mit DNA-Lösung gefüllte Injektionskapillare eingespannt wurde. Diese Injektionspipette, deren Durchmesser an der Spitze 1 bis 2 μm betrug, wurde mit einem Kapillarziehgerät Typ 'Livingston' (Fa. Bachofer) ausgezogen und durch Kapillarkraft mit DNA-Lösung befüllt. Die Injektionspipette wurde auf die Schärfeebene der Vorkerne gebracht und in die Zygote eingestochen. Mittels des piezoelektrischen Antriebs wurde die Kapillare durch die Vorkernmembran in einen der Vorkerne vorgeschoben. Durch Druckluft erfolgte die Injektion entweder bei kontinuierlichem DNA-Fluß oder nach Druckfreigabe, wenn die Pipette in den Vorkern penetriert war. Die Expansion des Vorkerns zeigte die erfolgreiche Injektion von einigen pl der DNA-Lösung an. Bei einer Injektion wurden je nach Konzentration der entsprechenden Genlösung zwischen 300 und 3500 Kopien eines Gens in den Vorkern injiziert.

Nach der Injektion wurden die Zygoten noch für ca. 2 Stunden kultiviert, um die durch die Manipulation degenerierten Embryonen zu erkennen und aussortieren zu können.

3.2.4 Transfer

Der Transfer der Zygoten in die Eileiter des Empfängerkaninchens erfolgte in Vollnarkose. Die Narkotisierung, die Operationsvorbereitung und der Zugang in der Linea alba erfolgte in gleicher Weise wie bei der in vivo Embryogewinnung (siehe 3.2.2). Folgende 3 Geräte wurden wahlweise zum Transfer benutzt:

- Transferpettor (5 μ l).
- Transferpettorcap (20 μ l), vorne leicht gekrümmt, das über einen Schlauch mit einer 1 ml-Spritze verbunden war.
- Transferpettorcap (20 μ l), vorne rund gebogen, ebenfalls über einen Schlauch mit einer Spritze verbunden.

Die Schwierigkeit beim Transfer bestand darin, das Übertragungsgerät möglichst weit um die durch das Gekröse festgelegte Krümmatur, in die Tuba vorzuschieben. Dabei sollte möglichst das Gekröse nicht zerrissen und keine Blutungen an den stark vaskularisierten Fimbriae tubae verursacht werden. Mit dem Transferpettor konnten die Zygoten zwar in kleinem Mediumvolumen übertragen werden, aber die Manövrierfähigkeit war durch das starre Gerät stark eingeschränkt. Bessere Handhabung gewährleisteten die flexibleren Transferpettorcap-Schlauch-Verbindungen. Die vorne gebogene Variante konnte in den meisten Fällen bis um die Tubenkrümmung vorgeschoben werden.

Der 5 μ l fassende Transferpettor wurde so befüllt, daß an der Spitze noch ca. 1 μ l Luft aufgezogen wurde. Damit konnte ein Auslaufen durch Kapillarkräfte beim Berühren von Gewebe verhindert werden. Die 20 μ l fassenden Transferpettorcaps wurden, wie in Abbildung 8 dargestellt, befüllt. Das Mediumvolumen betrug bei der Übertragung mit dem Transferpettor ca. 4 μ l und bei den Transferpettorcaps 10 bis 15 μ l.

Die zwischen den beiden Mediumtropfen liegende Luft war beim Absetzen der Zygoten als deutliche, kleine Luftblase im Eileiter zu erkennen und diente somit als Kontrolle für das erfolgreiche Absetzen der Embryonen.

Der Operateur untersuchte das Ovar auf Ovulationsstellen und fixierte den Eileiter, so daß der Assistent das befüllte Transfergerät in die Tuba vorschieben und die Embryonen absetzen konnte. Der Transfer erfolgte bilateral. Es wurden 3 bis 22 manipulierte Zygoten pro Eileiter übertragen. Bei Kontrolltransfers wurden 5 bis 10 Embryonen pro Seite übertragen.

Der Verschuß der Bauchhöhle und die Versorgung nach der Operation erfolgte wie nach der in vivo Embryogewinnung (siehe 3.2.2).

Abbildungen 3: Geräteaufbau

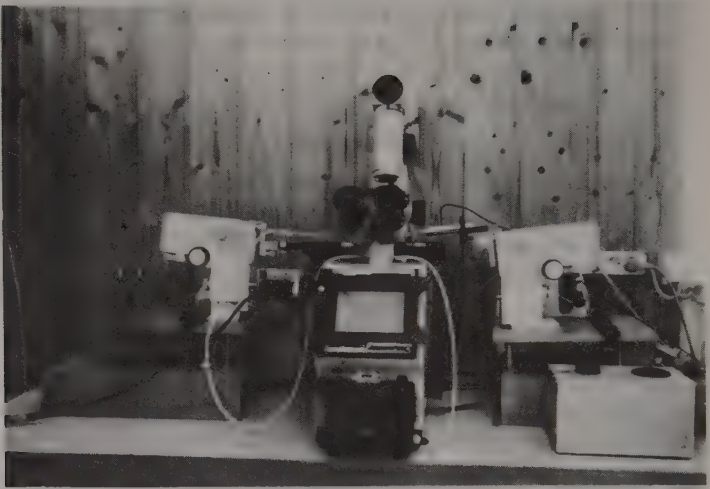


Abbildung 4: Geräteaufbau

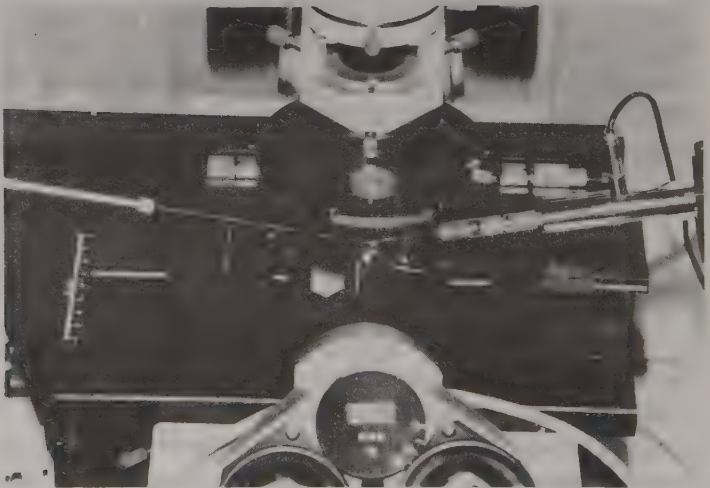


Abbildung 5: Kaninchenzygote vor der Injektion



Abbildung 6: Kaninchenzygote nach der Injektion

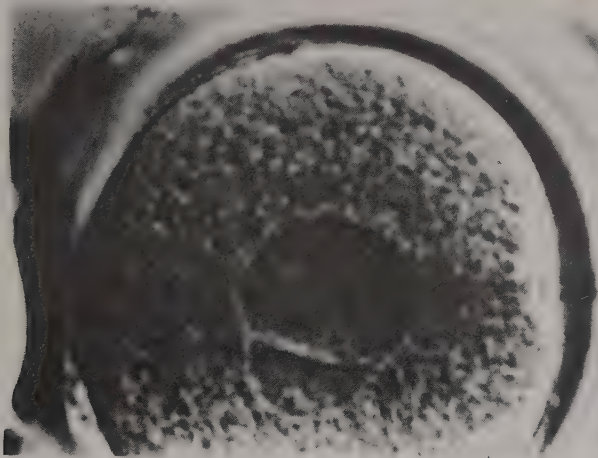


Abbildung 7: Transferpettor und Transferpettorcap-Schlauch-Verbindung

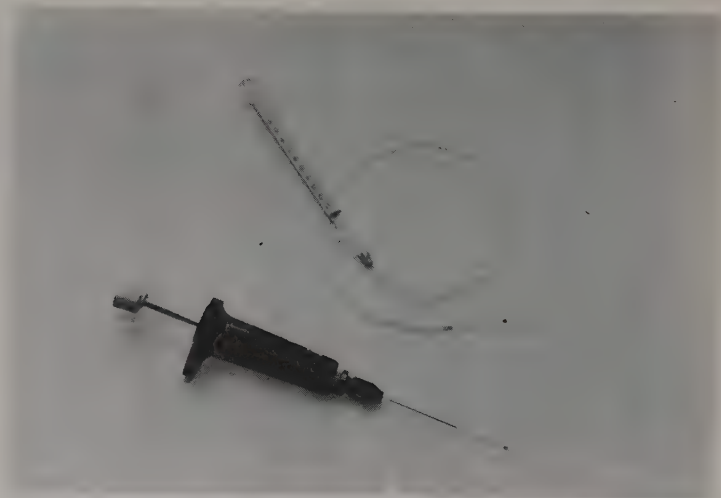
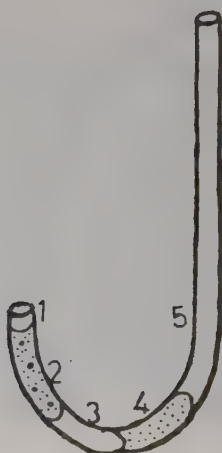


Abbildung 8: Befülltes, vorne rund gebogenes Transferpettorcap



- 1: ganz wenig Luft
- 2: Medium und Embryonen
- 3: Luft
- 4: Medium
- 5: Luft

3.2.5 Probenentnahme

Die aus Transfer geborenen Jungtiere wurden im Alter von 6 Wochen von der Empfängerhäs in abgesetzt.

Zur Untersuchung, ob diese Jungtiere das in die Zygoten injizierte Gen in ihr Genom integriert hatten, wurden folgende Proben gewonnen:

- bei toten Jungen: Gewebeproben
- bei lebenden Tieren: - Gewebe aus der Schwanzspitze
- Leukozytenfraktion aus einer Blutprobe.

Das Absetzen des ca. 1 cm langen Gewebestücks von der Schwanzspitze des Jungtiers erfolgte im zweiten Lebensmonat, nach Sedation mit 0,2 ml Vetranquil^R 1 % (Fa. Albrecht). Im Alter von 5 bis 6 Monaten wurde den Kaninchen 5 ml Blut aus der Ohrvene entnommen und die Leukozyten durch Zentrifugation im Ficollgradienten gewonnen. Die Untersuchung der Leukozyten erfolgte, um die Genintegration auch bei einem Tier festzustellen, welches das injizierte Gen nicht in allen Körperzellen integriert hat, also ein genetisches Mosaik darstellt.

Die Untersuchung der Proben auf Integration der DNA (Southern Blot, Dot Blot) erfolgte ebenso wie die Klonierung der Konstrukte bzw. das Aufbereiten der Injektionslösungen im Rahmen einer anderen Arbeit (BRENIG, 1987) im Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München im Labor von Prof. E.-L. Winnacker.

4. ERGEBNISSE

4.1 EMBRYOGEWINNUNG

Zur Beurteilung der Ergebnisse der Embryogewinnung wurden die Anzahl der gewonnenen Eizellen aus superovulierten Spendertieren und die Befruchtungsergebnisse ausgewertet. Die Anzahl der Ovulationspunkte konnte nicht zur Beurteilung des Superovulationsergebnisses herangezogen werden, da dieser Wert nicht durchgehend erfaßt wurde.

4.1.1 Superovulation

Von 168 superovulierten Spenderkaninchen wurden insgesamt 3188 Eizellen gewonnen. Das entspricht einer durchschnittlichen Eizellenanzahl von 19 pro Tier. Dieser Wert schließt die befruchteten und unbefruchteten Eizellen aller superovulierten Kaninchen ein. Von diesen 168 Häsinnen zeigten 3 (2 %) überhaupt keine Ovarreaktion und lieferten auch keine Eizellen. Von 17 Tieren (10 %) konnten nur weniger als 5 Eizellen gewonnen werden und bei weiteren 25 Tieren (15 %) nur zwischen 5 und 9 Eizellen. Insgesamt 45 Kaninchen (27 %) reagierten demnach auf die PMSG-Injektion nicht mit Superovulation. Von den verbleibenden 123 Häsinnen wurden 2961 Eizellen gewonnen (24 Eizellen/Spender).

4.1.1.1 Rasseeinfluß

Da für die Versuche nicht auf vorhandenes Tiermaterial zurückgegriffen werden konnte, wurden Tiere aus verschiedenen Herkunftsbeständen angekauft. Der weitaus größte Anteil der Kaninchen waren Kreuzungstiere aus großen und mittelgroßen Kaninchenrassen. Die anderen Rassegruppen waren zahlenmäßig wesentlich geringer, aber da sich diese Tiere auch nach Herkunft und Alter unterschieden (siehe 3.1.1), sind sie getrennt aufgeführt. Die Superovulationsergebnisse der unterschiedlichen Rassen sind in Tabelle 10 zusammengestellt.

Die Kreuzungstiere aus kleinen und mittelgroßen Kaninchenrassen wiesen ein signifikant ($p < 0,05$) besseres Superovulationsergebnis auf als die drei anderen Rassegruppen.

Tabelle 10: Raseeinfluß auf das Superovulationsergebnis.

RASSE	ANZAHL		MINIMUM	MAXIMUM
	Spender	Eizellen		
große Kreuzungstiere	128	17,77 ^a	0	56
kleine Kreuzungstiere	7	33,43 ^b	16	50
ZIKA ^R -Hybriden	14	19,57 ^c	0	35
sonstige Rassen	19	21,32 ^d	0	46
Summe	168	18,97	0	56

a:b = $p < 0,001^*$

*Mittelwertsvergleich mit Varianzanalyse

c:b = $p < 0,05$

d:b = $p < 0,05$

Die Superovulationsergebnisse der anderen Rassegruppen unterschieden sich nicht signifikant. Das Ergebnis der sonstigen Rassen lag geringfügig über dem der anderen beiden Rassegruppen. Die Ursache liegt darin, daß in dieser Gruppe die Ergebnisse von 3 Kalifornierkaninchen (mit 21, 32 und 43 Eizellen pro Tier) eingehen, die aus einer Zuchtlinie mit guten Superovulationseigenschaften stammten (SCHILLING, 1986).

4.1.1.2 Vergleich zwischen Tieren ohne vorherigen Versuchseinsatz mit vorgenutzten Kaninchen

Vorgenutzte Kaninchen sind ehemalige Empfängertiere sowie Tiere aus in vivo Embryogewinnung, die nach einer entsprechenden Ruheperiode er-

neut superovuliert wurden. In Tabelle 11 wurden die Superovulations-
ergebnisse

- von vorge nutzten Kaninchen und

- nicht vorge nutzten Kaninchen

gegenüber gestellt.

Tabelle 11: Superovulationsergebnisse von Tieren ohne vorherigen
Versuchseinsatz und vorge nutzten Kaninchen

	ANZAHL	
	Spender	Eizellen
Tiere ohne vorherigen Versuchseinsatz	117	20,49 ^a
Ehemalige in vivo Spen- der und Empfänger	51	15,51 ^b
Summe	168	18,97

a:b = $p < 0,05^*$

*Mittelwertsvergleich mit Varianzanalyse

Es zeigte sich, daß Häsinnen ohne vorherigen Versuchseinsatz ein
signifikant ($p < 0,05$) besseres Superovulationsergebnis (20,5 Eizellen)
erreichten als vorge nutzte Tiere (15,5 Eizellen).

Von den 51 vorge nutzten Kaninchen reagierten 23 (45 %) mit weniger als
10 Eizellen nicht auf die Superovulationsinduktion. Die Ausfallrate
bei den 117 ungenutzten Spenderkaninchen betrug nur 19 % (22 Tiere).
Bei Auswertung dieser Zahlen mit dem χ^2 -Test erwies sich die Ausfall-
rate der vorge nutzten Tiere als signifikant ($p < 0,001$) höher.

4.1.1.3 Einfluß der Jahreszeit

In Abbildung 7 ist die durchschnittliche Eizellenanzahl pro Tier, verteilt auf die Monate, dargestellt. Vom August liegen keine Werte vor, da in diesem Monat keine Versuchstermine stattfanden. Es zeigte sich, daß mit Ausnahme der Monate Juli und September, die durchschnittlichen Superovulationsergebnisse relativ konstant bei 20 (17 bis 22) Eizellen pro Tier im Mittel lagen. Abweichend sind die Werte im Juli mit durchschnittlich 11 und im September mit 15 Eizellen pro Tier.

Für die saisonale Auswertung wurde folgende Zuordnung gewählt:

- Winter: November, Dezember, Januar
- Frühling: Februar, März, April
- Sommer: Mai, Juni, Juli
- Herbst: September, Oktober

Tabelle 12 zeigt, daß das Superovulationsergebnis im Winter und Frühling etwas besser ist als im Sommer und Herbst. Die Varianzanalyse ergab jedoch, daß diese Unterschiede nicht signifikant sind.

4.1.1.4 Einfluß der Art der Embryogewinnung

Zu Beginn der Versuche wurden bei 27 Spendern die Embryonen durch einen operativen Eingriff gewonnen.

Die Embryogewinnung bei den restlichen 141 Spenderkaninchen erfolgte nach Schlachtötung der Tiere. Ein Vergleich der Superovulationsergebnisse zwischen Eileiterspülung in vivo und Embryogewinnung nach Schlachtung zeigt, daß bei operativer Gewinnung etwa 4 Eizellen weniger gewonnen werden konnten (Tabelle 13). Die varianzanalytische Auswertung ergab, daß dieser Unterschied nicht signifikant ist.

Bei 4 Häsinnen, die zu den ersten beiden Versuchsterminen gespült wurden, stellte sich nachfolgend eine Trächtigkeit ein. Nach 32 bis 33 Tagen Trächtigkeitsdauer warfen diese Embryonenspender 2 bis 6 lebensfähige Jungtiere.

Abbildung 9: Jahreszeitliche Verteilung der Superovulationsergebnisse

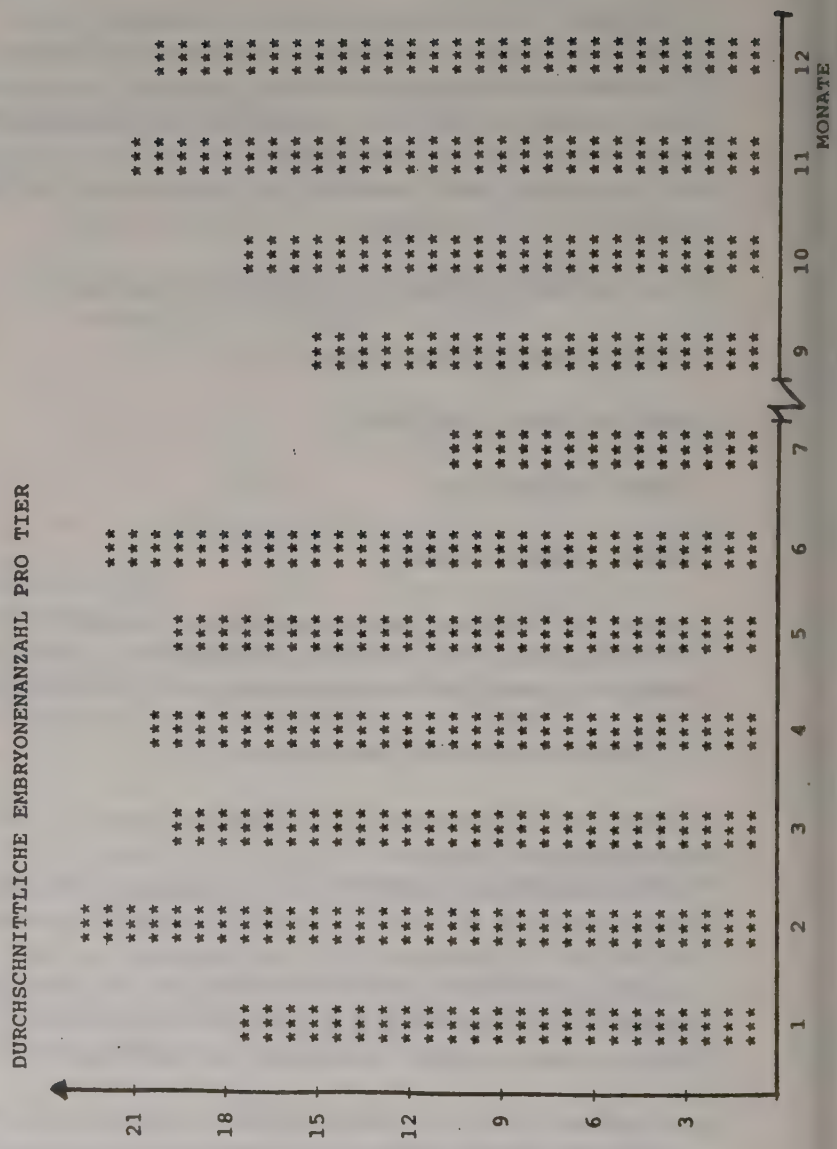


Tabelle 12: Saisonale Variationen des Superovulationsergebnisses

JAHRESZEIT	ANZAHL	
	Spender	Eizellen
Winter	71	20,15
Frühling	35	20,77
Sommer	31	16,52
Herbst	31	16,71
Summe	168	18,97

Tabelle 13: Einfluß der Art der Embryogewinnung auf das Superovulationsergebnis

EMBRYOGEWINNUNG	ANZAHL	
	Spender	Eizellen
operativ	27	15,74
nach Schlachtung	141	19,60
Summe	168	18,97

4.1.2 Befruchtungsergebnis

Zur Beurteilung der erfolgreichen Belegung und Befruchtung von superovulierten Spendern wurden folgende 3 Parameter untersucht:

- Befruchtungsrate (BR)

Von den 3188 Eizellen, die von den 168 Spenderkaninchen stammten, waren 2000 Zygoten, also befruchtete Eizellen. Daraus ergab sich eine Gesamtbefruchtungsrate von 63 %. Bei den restlichen 1188 Eizellen (37 %) konnten weder Spermien im perivitellinen Raum noch das zweite Polkörperchen nachgewiesen werden. Es handelte sich also um unbefruchtete Eizellen.

- Konzeptionsrate (KR)

Von den 168 Spendertieren konnten aus 136 mindestens eine befruchtete Eizelle ausgespült werden (Konzeptionsrate: 81 %). Von den verbleibenden 32 Tieren (19 %) konnten nur unbefruchtete Eizellen gewonnen werden. Von diesen 32 Kaninchen wurden insgesamt 784 Eizellen gewonnen. Das entspricht 66 % aller unbefruchteten Eizellen und 24 % aller insgesamt gewonnenen Eizellen.

Aus diesen Zahlen geht hervor, daß ein sehr hoher Prozentsatz unbefruchteter Eizellen aus Spendertieren stammte, die nicht konzipiert hatten. Um diesen Einfluß bei der Beurteilung des Befruchtungsergebnisses von superovulierten Kaninchen zu eliminieren, wurde zusätzlich die korrigierte Befruchtungsrate bestimmt.

- Befruchtungsrate bei Spendern, die konzipiert hatten (korrigierte Befruchtungsrate)

Aus 136 Spendern (81 % aller Tiere), die nach Abzug der Spendertiere, die nicht konzipiert hatten, verbleiben, konnten 2404 Eizellen gewonnen werden. Davon waren 2000 Zygoten (83 %) und 404 unbefruchtete Eizellen (17 %). Diese 404 unbefruchteten Eizellen machten 34 % aller unbefruchteten Eizellen und 12,5 % der Gesamtanzahl gewonnener Eizellen aus.

In Tabelle 14 sind die Befruchtungsraten dargestellt.

Tabelle 14: Befruchtungsraten

BEFRUCHTUNGSRATEN	ANZAHL			
	SPENDER	EIZELLEN	ZYGOTEN	UNBEFRUCHTETE EIZELLEN
Gesamt	168	3188	2000	1188
BR			(63 %)	(37 %)
korrigierte	123	2404	2000	404
BR			(81 %)	(19 %)

4.1.2.1 Vergleich zwischen natürlichem Deckakt und künstlicher Besamung

Da die Belegung der superovulierten Häsinnen im natürlichen Deckakt zum Teil recht unbefriedigend funktionierte, wurde am Ende der Versuchsperiode künstliche Besamung eingesetzt. 18 Häsinnen wurden mit Frischsperma besamt. Um die Auswirkungen des Einsatzes der künstlichen Besamung zu beurteilen, wurden

- die Konzeptionsrate und
- die korrigierte Befruchtungsrate

bei natürlichem Deckakt und künstlicher Besamung gegenübergestellt (Tabelle 15 und 16).

Aus dieser Gegenüberstellung geht hervor, daß die Konzeptionsrate bei der künstlichen Besamung niedriger lag. War die Besamung jedoch erfolgreich und konnten aus einer künstlich besamten Häsinn Zygoten gewonnen werden, so war die Befruchtungsrate signifikant ($p < 0,001$) höher als beim natürlichen Deckakt.

Tabelle 15: Vergleich der K.B. mit dem natürlichen Deckakt
(Konzeptionsrate)

ANZAHL	NATÜRLICHER DECKAKT	KÜNSTLICHE BESAMUNG
Spender	150	18
Spender, die nicht konzipiert hatten	26 (17 %)	6 (33 %)
Spender, die konzipiert hatten (KR)	124 (83 %)	12 (67 %)

Tabelle 16: Vergleich der K.B. mit dem natürlichen Deckakt
(korrigierte Befruchtungsrate)

ANZAHL	NATÜRLICHER DECKAKT	KÜNSTLICHE BESAMUNG
Spender	124	12
Eizellen	2163	241
Zygoten	1776 (82 %) ^a	223 (92 %) ^b
unbefruchtete Eizellen	386 (18 %) ^c	18 (8 %) ^d

a:b = $p < 0,001^*$

c:d = $p < 0,001$

*Auswertung mit χ^2 -Test

4.2 EMBRYOTRANSFER

4.2.1 Trächtigkeitsrate (TR)

Insgesamt wurden auf 73 Empfängerkaninchen Embryonen übertragen. 21 Tiere kamen zur Geburt. Die daraus resultierende Gesamtträchtigkeitsrate betrug 29 %.

4.2.1.1 Einfluß der Vorovulation

ADAMS (1982b) beschrieb, daß es sich beim Einsatz von virginen Kaninchen zu Embryotransferversuchen als vorteilhaft erwiesen hat, bei den Tieren ca. 20 Tage vor Versuchsbeginn die Ovulation auszulösen. Um den Einfluß dieser Vorovulation zu testen, wurden gegen Ende der Versuchsperiode 21 Empfänger genau 3 Wochen vor der Synchronisationsovulation mit den Embryonenspendern mit HCG vorovuliert. Die Auswirkungen dieser Vorovulation sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Einfluß der Vorovulation auf die Trächtigkeitsrate

ANZAHL	OHNE VOROVULATION	MIT VOROVULATION	SUMME
Empfänger	52	21	73
Trächtigkeiten (TR)	12 (23 %)	9 (43 %)	21 (29 %)

Von den 52 nicht vorovulierten Empfängertieren wurden nur 23 % trächtig. Eine bessere Trächtigkeitsrate von 43 % erreichten die vorovulierten Empfänger. Eine Auswertung mit dem χ^2 -Test ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Um den Einfluß der Vorovulation statistisch beurteilen zu können, müssen weitere Versuche durchgeführt werden, um die Zahl der Transfers nach Vorovulation zu erhöhen.

4.2.1.2 Einfluß des Ovarbefundes

Bevor die Embryonen in die Eileiter der Empfängertiere transferiert wurden, erfolgte bei 33 Tieren eine Untersuchung der Ovarien auf Ovulationsstellen. Dieser Befund wurde nach folgender Einteilung beurteilt:

- sehr gut: mindestens 4 Ovulationen pro Ovar
- gut: zwischen 2 und 4 Ovulationen pro Ovar
- schlecht: weniger als 2 Ovulationen pro Ovar

In Tabelle 18 wurden die Trächtigkeitsraten in Abhängigkeit des Ovarbefunds aufgezeigt.

Tabelle 18: Einfluß des Ovarbefunds auf die Trächtigkeitsrate

ANZAHL	OVARBEFUND			SUMME
	sehr gut	gut	schlecht	
Empfänger	23	7	3	33
Trächtigkeiten (TR)	11 (44 %)	1 (14 %)	0 (0 %)	12 (36 %)

Bei mindestens 4 Ovulationen pro Ovar wurden 44 % der Tiere trächtig, während bei 2 bis 4 Ovulationen pro Ovar nur noch 14 % Trächtigkeiten auftraten. Bei schlechtem Ovarbefund wurden nur dann manipulierte Embryonen übertragen, wenn kein anderes Empfängerkaninchen zur Verfügung stand.

4.2.1.3 Einfluß der Übertragungstechnik

Bei der Übertragung der Embryonen in den Eileiter wurden wahlweise 3 verschiedene Übertragungsgeräte verwendet. Zur Beurteilung des Einflusses der Übertragungstechnik wurden die Ergebnisse der beiden 20 µl

fassenden Transferpettorcapvarianten zusammengefaßt und dem Ergebnis des 5 µl fassenden Transfepettor gegenübergestellt (Tabelle 19).

Tabelle 19: Einfluß der Übertragungstechnik auf die Trächtigkeitsrate

ANZAHL	TRANSFERGERÄT		SUMME
	Transferpettor 5 µl	Transferpettorcap Schlauch- Verbindungen 20 µl	
Empfänger	43	30	73
Trächtigkeiten (TR)	10 (23 %)	11 (37 %)	21 (29 %)

Die Transfers mit den flexibleren Transferpettorcap-Schlauch-Verbindungen, die sich einfacher und tiefer in die Tuba einführen ließen, führten häufiger (37 %) zu Trächtigkeiten als die Transfers mit dem starren Transferpettor (23 %). Der Unterschied war bei Untersuchung mit dem χ^2 -Test statistisch nicht signifikant.

4.2.1.4 Einfluß der Jahreszeit

Bei Einteilung des Jahres in Jahreszeiten wie bei der Auswertung des jahreszeitlichen Einflusses auf das Superovulationsergebnis (siehe 4.1.1.4), zeigte sich die in Tabelle 20 dargestellte Verteilung der Trächtigkeiten.

Es zeigte sich, daß die Trächtigkeitsraten im Sommer und Winter mit jeweils 46 % am höchsten waren, während im Herbst nur 1 Transfer zur Trächtigkeit führte. In 2 aufeinanderfolgenden Jahren konnten im Frühling (Februar, März, April) keine Trächtigkeiten nach Embryotransfer erzielt werden. Die statistische Auswertung mit dem χ^2 -Test ergab,

daß die Unterschiede zwischen den beiden hohen Trächtigkeitsraten im Sommer und Winter und den niedrigen Raten im Frühling und Herbst signifikant ($p < 0,05$) waren. Es ergab sich also ein deutlicher jahreszeitlicher Einfluß auf die Trächtigkeitsraten.

Tabelle 20: Einfluß der Jahreszeit auf die Trächtigkeitsrate

ANZAHL	SAISON				SUMME
	Winter	Frühling	Sommer	Herbst	
Empfänger	37	12	11	13	73
Trächtigkeiten (TR)	15(46 %) ^a	0(0 %) ^b	5(46 %) ^c	1(8 %) ^d	21(29 %)

a:b = $p < 0,01^*$

*Auswertung mit χ^2 -Test

a:d = $p < 0,05$

c:b = $p < 0,01$

c:d = $p < 0,05$

4.2.2 Einfluß der Mikroinjektion

In Tabelle 21 wird die Trächtigkeitsrate nach Transfer mikroinjizierter Embryonen der Trächtigkeitsrate von Kontrolltransfers gegenübergestellt.

Die Trächtigkeitsrate nach Transfer mikroinjizierter Embryonen lag geringgradig höher als die der Kontrolltransfers. Es zeichnete sich kein Einfluß der Mikroinjektion auf die Trächtigkeitsrate ab.

Tabelle 21: Trächtigkeitsraten von Transfers mikroinjizierter Embryonen und von Kontrolltransfers

ANZAHL	ZYGOTEN		SUMME
	unbehandelt	mikroinjiziert	
Empfänger	12	61	73
Trächtigkeiten (TR)	3 (25 %)	18 (30 %)	21 (29 %)

4.2.2.1 Vergleich der mikroinjizierten Genkonstrukte

Die Trächtigkeitsraten nach Transfer von mit unterschiedlichen Genkonstrukten mikroinjizierten Embryonen (Tabelle 22) zeigen nur geringe Unterschiede.

Tabelle 22: Einfluß des Genkonstrukts auf die Trächtigkeitsrate

ANZAHL	GENKONSTRUKTE				SUMME
	mMT ₁ -hGH	TO-CAT	hMT II _A -Mx	mMT ₁ -GRF	
Empfänger	28	11	6	16	61
Trächtigkeiten (TR)	7(25 %)	4(36 %)	2(33 %)	5(31 %)	18(30 %)

4.2.2.2 Einfluß der Anzahl mikroinjizierter, transferierter Embryonen

Es wurden zwischen 6 und 40 mikroinjizierte Zygoten pro Empfänger übertragen. Zur Auswertung wurden bei der Zahl der übertragenen Embryonen pro Empfänger Gruppen gebildet (Tabelle 23):

- weniger als 15 Embryonen
- 15 bis 20 Embryonen
- mehr als 20 Embryonen

Tabelle 23: Einfluß der Anzahl mikroinjizierter, transferierter Embryonen auf die Trächtigkeitsrate

ANZAHL	EMBRYONENANZAHL = X			SUMME
	X < 15	15 < X < 20	X > 20	
Empfänger	18	23	20	61
Trächtigkeiten (TR)	2 (11 %) ^a	6 (26 %) ^a	10 (50 %) ^b	18 (30 %) ^b

a:b = $p < 0,05^*$

*Auswertung mit dem χ^2 -Test

Wurden mehr als 20 mikroinjizierte Embryonen in ein Empfängertier transferiert, so kamen signifikant ($p < 0,05$) mehr Empfängerkaninchen zur Geburt als beim Transfer von weniger als 15 Embryonen. Das Ergebnis beim Transfer von 15 bis 20 Embryonen lag in der Mitte.

4.3 EMBRYOMANIPULATION

Um den Einfluß der Manipulation auf die Kaninchenembryonen zu beurteilen, wurde die Anzahl degenerierter Embryonen nach Mikroinjektion (Degenerationsrate) und die Überlebensfähigkeit mikroinjizierte Zygoten nach Transfer erfaßt und ausgewertet.

4.3.1 Degenerationsrate (DR) nach Mikroinjektion

Insgesamt wurden 1514 Zygoten mikroinjiziert. 235 dieser Embryonen waren nach ca. 2 Stunden Kultur in einem Mediumtropfen degeneriert und wurden nicht auf pseudogravide Empfängertiere übertragen. Das entspricht einer Degenerationsrate von 15,5 %.

Im Versuchsablauf wurden zunächst das mMT_1 -hGH, dann das TO-CAT, darauf folgend das $hMT\ II_A$ -Mx und zuletzt das mMT_1 -GRF mikroinjiziert. In Tabelle 24 sind diese Genkonstrukte in zeitlicher Reihenfolge mit den zugehörigen Degenerationsraten dargestellt.

Tabelle 24: Degenerationsraten abhängig vom Genkonstrukt

ANZAHL	GENKONSTRUKTE				SUMME
	mMT_1 -hGH	TO-CAT	$hMT\ II_A$ -Mx	mMT_1 -GRF	
injizierte Embryonen	576	298	128	512	1514
degeneriert (DR)	120(21 %) ^a	32(11 %) ^b	31(24 %) ^c	52(10 %) ^d	235(16 %)

a:b = $p < 0,001$ *

a:d = $p < 0,001$

c:b = $p < 0,001$

c:d = $p < 0,001$

*Auswertung mit dem χ^2 -Test

Die Degenerationsrate war bei Injektion des Genkonstrukts hMT II_A-Mx am höchsten und signifikant ($p < 0,001$) höher als die Degenerationsraten der beiden Genkonstrukte TO-CAT und mMT₁-GRF. Die zweithöchste Degenerationsrate ergab sich nach Mikroinjektion des mMT₁-hGH. Auch hier war der Unterschied signifikant ($p < 0,001$) zu den Ergebnissen bei den Konstrukten TO-CAT und mMT₁-GRF. Bei Vernachlässigung des Ergebnisses von hMT II_A-Mx konnte ein Abfall der Degenerationsraten mit fortschreitendem Versuchshergang von 21 % auf 10 % festgestellt werden.

4.3.2 Überlebensrate (ÜR) mikroinjizierter, transferierter Embryonen

Um die Überlebensfähigkeit der mikroinjizierten Zygoten zu testen und transgene Tiere zu erhalten, wurden 1143 mikroinjizierte Embryonen in die Eileiter von 61 pseudograviden Empfängerkaninchen transferiert. Es wurden insgesamt 68 Jungtiere geboren. Daraus resultiert eine Überlebensrate von 6 %. In Tabelle 25 ist diese Überlebensrate der von Kontrollembryonen gegenübergestellt.

Tabelle 25: Vergleich der Überlebensraten von mikroinjizierten - und Kontrollembryonen

ANZAHL	KONTROLLEN	MIKROINJIZIERTE EMBRYONEN
transferierte Embryonen	158	1143
Junge (ÜR)	16 (10 %) ^a	68 (6 %) ^b

a: b = $p < 0,05$ *

*Auswertung mit dem χ^2 -Test

Die Überlebensfähigkeit mikroinjizierter Embryonen ist gegenüber unbehandelten Kontrollembryonen signifikant ($p < 0,05$) herabgesetzt.

Einen Vergleich zwischen Überlebensfähigkeit der mit unterschiedlichen Genkonstrukten injizierten Embryonen und Kontrollembryonen zeigt Tabelle 26.

Tabelle 26: Überlebensraten in Abhängigkeit vom Genkonstrukt

ANZAHL	KONTROLLEN	GENKONSTRUKTE			
		mMT ₁ -hGH	TO-CAT	hMT II _A -Mx	mMT ₁ -GRF
transferierte Embryonen	158	456	189	146	349
Junge (ÜR)	16 (10 %) ^a	38 (8 %)	13 (7 %)	6 (4 %) ^b	11 (3 %) ^c

a:b = $P < 0,05$ *

*Auswertung mit dem χ^2 -Test

a:c = $p < 0,001$

Es zeigte sich ein kontinuierlicher Abfall der Überlebensfähigkeit mikroinjizierter Zygoten bei den mit fortschreitendem Versuchshergang nacheinander eingesetzten Genkonstrukten mMT₁-hGH, TO-CAT, hMT II_A-Mx und mMT₁-GRF. Außerdem sind die Überlebensraten mikroinjizierter Zygoten der beiden Genkonstrukte mMT₁-hGH und TO-CAT nicht signifikant schlechter als die der Kontrollembryonen.

Da die Methode des Embryotransfers am Institut neu etabliert wurde, waren die unspezifischen Einflüsse vom Tiermaterial und der Transfertechnik besonders hoch. Aus diesem Grund werden in Tabelle 27 und 28 die Überlebensraten der mikroinjizierten Embryonen und der Kontrollembryonen nur der tragenden Empfängertiere gegenübergestellt.

Auch hier zeigte sich, daß die Überlebensfähigkeit mikroinjizierter Embryonen signifikant ($p < 0,01$) herabgesetzt ist.

Beim Vergleich der Überlebensraten von tragenden Empfängertieren zwischen den mit unterschiedlichen Genkonstrukten mikroinjizierten Embryonen ergab sich für die mit mMT₁-hGH injizierten Embryonen eine

signifikant ($p < 0,05$) bessere Überlebensrate als für alle anderen mikroinjizierten Embryonen. Auch zeigte sich die Überlebensrate der mit diesem Konstrukt injizierten Embryonen nicht signifikant schlechter als die der Kontrollembryonen.

Tabelle 27: Vergleich der Überlebensrate von mikroinjizierten und Kontrollembryonen in tragenden Empfängern

ANZAHL	KONTROLLEN	MIKROINJIZIERTE EMBRYONEN
transferierte Embryonen	42	358
Junge (ÜR)	16 (38 %) ^a	68 (19 %) ^b

a:b = $p < 0,01^*$ *Auswertung mit dem χ^2 -Test

Tabelle 28: Überlebensraten abhängig vom Genkonstrukt bei tragenden Empfängern

ANZAHL	KONTROLLEN	GENKONSTRUKTE			
		mMT ₁ -hGH	TO-CAT	hMT II _A -Mx	mMT ₁ -GRF
transferierte Embryonen	24	115	74	51	118
Junge (ÜR)	16(38 %) ^a	38(33 %) ^b	13(18 %) ^c	6(12 %) ^d	11(9 %) ^e

a:c = $p < 0,05^*$

*Auswertung mit dem χ^2 -Test

a:d = $p < 0,01$

a:e = $p < 0,001$

b:c = $p < 0,05$

4.4 JUNGTIERE AUS DNA-MIKROINJEKTION

Es entwickelten sich insgesamt 68 Jungtiere aus mikroinjizierten Zygoten. Sie verteilten sich folgendermaßen auf die einzelnen Genkonstrukte:

- 38 Junge aus mMT₁-hGH-Injektion
- 13 Junge aus TO-CAT-Injektion
- 6 Junge aus hMT II_A-Mx-Injektion
- 11 Junge aus mMT₁-GRF-Injektion

4.4.1 Totgeburtenrate (ToR)

Von den 68 Jungtieren aus DNA-Mikroinjektion wurden 38 tot geboren und 30 kamen lebend zur Welt. Der Prozentsatz totgeborener Jungtiere aus mikroinjizierten Embryonen betrug 56 %. Aus den 3 Würfen der Kontrolltransfers stammten 16 Jungtiere. 11 Junge davon wurden tot geboren und 5 lebend. Die resultierende Totgeburtenrate für Kontrollembryonen betrug 69 %. Für die einzelnen Genkonstrukte ergeben sich die in Tabelle 29 dargestellten Totgeburtenraten.

Tabelle 29: Totgeburtenraten

ANZAHL	GENKONSTRUKTE				SUMME
	mMT ₁ -hGH	TO-CAT	hMT II _A -Mx	mMT ₁ -GRF	
Jungtiere	38	13	6	11	68
Totgeborene (ToR)	24 (63 %) ^a	3 (23 %) ^b	5 (83 %) ^c	6 (54 %)	38 (56 %)

b:a = $p < 0,05^*$

b:c = $p < 0,05$

*Auswertung mit dem χ^2 -Test

Jungtiere, die aus der Injektion von TO-CAT stammten waren signifikant ($p < 0,05$) lebensfähiger als die Jungtiere der Injektionen von mMT_1 -hGH und $hMT\ II_A$ -Mx.

4.4.2 Integration von Fremd-DNA

Von allen 68 geborenen Jungtieren wurden Gewebeproben und zum Teil auch Blutproben im Rahmen der Arbeit von BRENIG (1987) auf Integration der Fremdgene untersucht. Bei allen Jungtieren, die sich aus Zygoten entwickelten, die mit den Genkonstrukten TO-CAT und $hMT\ II_A$ -Mx mikroinjiziert wurden, konnte keine Fremd-DNA im Genom nachgewiesen werden. Aus der Injektion von mMT_1 -hGH und mMT_1 -GRF entstanden transgene Tiere.

4.4.2.1 mMT_1 -hGH

Von den 38 Jungtieren hatten 9 das fremde Genfragment in ihr Genom integriert. Daraus resultiert eine Integrationsrate von 24 %. Diese 9 transgenen Kaninchen entwickelten sich aus 576 mit mMT_1 -hGH mikroinjizierten Zygoten. Das entspricht einer Gesamteffektivität von 1,6 %.

3 dieser transgenen Jungtiere wurden lebend geboren und entwickelten sich zu erwachsenen Rammlern, während die anderen alle bereits bei der Geburt tot waren. Eine Untersuchung der Expression des menschlichen Wachstumshormons konnte bei diesen 3 Tieren nicht durchgeführt werden, da der hGH-Radio-Immuno-Assay wegen Kreuzreaktionen eine Untersuchung von Kaninchenblut nicht erlaubt.

4.4.2.2 mMT_1 -GRF

Von den 11 Jungtieren, die aus der Injektion des mMT_1 -GRF stammten, konnte bei einem Tier die Integration der fremden DNA nachgewiesen werden.

Dieses transgene Kaninchen ist eine lebende Häsin und war bei Beendigung der Arbeit noch zu jung, um Blut zu weiteren Untersuchungen zu gewinnen.

5. DISKUSSION

5.1 EMBRYOGEWINNUNG UND -TRANSFER

In der umfangreichen Literatur über den Embryotransfer beim Kanichen wurden nur wenige Ergebnisse über das frühe Stadium der Zygote veröffentlicht. Daher war es Ziel dieser Arbeit, die Gewinnung und den Transfer von Kanichenzygoten im Hinblick auf den Gentransfer zu untersuchen.

Zur Embryogewinnung wurden 168 Spenderkaninchen durch einmalige PMSG-Injektion superovuliert. STROJEK (1986) verzichtete bei der Gewinnung von Kaninchenembryonen zur Mikroinjektion auf die Superovulation. Er begründete dies mit den Beobachtungen von HAHN et al. (1977), daß sich superovulierte Kanincheneizellen nach in vitro Befruchtung weniger häufig zu Foeten entwickelten als nur mit HCG ovulierte Eizellen. Demgegenüber kamen MAURER et al. (1968b) und SCHILLING und KÜMEL (1985) zu dem Ergebnis, daß superovulierte Kaninchenembryonen die gleiche Entwicklungspotenz und Überlebensfähigkeit nach Transfer besitzen wie normal ovulierte.

Von den 168 superovulierten Kaninchen konnten durchschnittlich 19 Embryonen gewonnen werden. 45 dieser Embryonenspender hatten jedoch mit weniger als 10 Eizellen nicht auf die hormonelle Superovulationsinduktion reagiert.

Es zeigte sich weiterhin, daß das Superovulationsvermögen bei den Kaninchen der einzelnen Rassegruppen unterschiedlich war. So reagierten die Kreuzungstiere aus kleinen und mittelgroßen Kaninchenrassen aus einer Zucht mit durchschnittlich 33 Eizellen signifikant ($p < 0,05$) besser auf die Superovulationsinduktion als die anderen Tiere. Diese Beobachtung wurde auch in der Literatur beschrieben: So stellten HAHN und GABLER (1971) anhand der Anzahl gewonnener Eizellen von mit HCG ovulierten Kaninchen fest, daß ein genetischer Einfluß auf die Anzahl ovulierter Eizellen beim Kaninchen besteht. MAURER und FOOTE (1971) gingen davon aus, daß auch das Superovulationsvermögen beim Kaninchen von der Rasse bzw. Zuchtlinie abhängt. Einen signifikanten Unterschied in der Superovulationsreaktion wiesen ROTTMANN und STRANZINGER (1977) zwischen zwei Zuchtlinien weißer Neuseeländerkaninchen nach.

Nach Abzug der 45 Häsinnen, die nicht auf die Superovulationsinduktion angesprochen hatten, verbleiben 123 Spendertiere. Von diesen konnten durchschnittlich 24 Eizellen gewonnen werden. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß keine Tiere mit getesteten Superovulationseigenschaften verwendet werden konnten, ist dieses Ergebnis mit dem Ergebnis von ROTTMANN und STRANZINGER (1977) für eine nicht näher charakterisierte Zuchtlinie weißer Neuseeländer vergleichbar. Von dieser nicht auf Fruchtbarkeitsparameter selektierten Linie wurden nach Superovulation mit einer einmaligen PMSG-Injektion durchschnittlich 25 Ovulationen beobachtet. Bei einer über mehrere Generationen auf Wurfgröße selektierten Zuchtlinie beschrieben ROTTMANN und STRANZINGER (1977) jedoch durchschnittlich 48 Ovulationen und TSUTSUMI et al. (1980) (Zit. nach ADAMS, 1982b) erreichten sogar 61 Ovulationen pro Tier nach einmaliger PMSG-Applikation. Bei einem Vergleich dieser Ergebnisse mit den eigenen Versuchsergebnissen muß allerdings berücksichtigt werden, daß ROTTMANN und STRANZINGER (1977) und TSUTSUMI et al. (1980) jeweils die Anzahl der Corpora lutea ausgewertet haben und die Anzahl gewonnener Eizellen im allgemeinen etwas geringer ist. Bei diesen beiden Autoren wurden keine Angaben über die Anzahl gewonnener Eizellen gemacht. In anderen Literaturstellen werden Wiederfindungsraten zwischen 82 % und 89 % (MEIER, 1972; SCHILLING und KÜMEL, 1985) angegeben.

Ein weiterer Faktor, der das Superovulationsergebnis beeinflußt hat, war die Verwendung von Kaninchen als Embryonenspender, die vorher bereits im Versuch eingesetzt worden waren. MAURER et al. (1968a) stellten bei wiederholter Superovulation und Ovulationsauslösung beim Kaninchen einen Abfall der Ergebnisse mit jeder Behandlung fest. Sie führten dies auf immunologische Inaktivierung der eingesetzten Hormone zurück. Die vorgenutzten Tiere wurden in vorhergehenden Versuchen entweder als in vivo Spender superovuliert oder als Empfänger mit HCG synchronisiert. Durch den operativen Eingriff kam es außerdem teilweise zu Verklebungen und Verwachsungen der Tuba und der Fimbriae tubae mit dem Ovar. Das erklärt, daß signifikant ($p < 0,05$) weniger Eizellen aus vorgenutzten Spenderkaninchen gewonnen werden konnten. Dieses Ergebnis ist darauf zurückzuführen, daß von den vorgenutzten Tieren 45 % nicht auf die Superovulationsinduktion reagierten, während von den Tieren, die zum ersten Mal eingesetzt wurden, nur 19 % nicht reagierten. Dieser Unterschied war mit $p < 0,001$ signifikant.

Neben der Rasse und der Vornutzung der Kaninchen hatte auch die Jahreszeit einen geringfügigen Einfluß auf das Superovulationsergebnis. Bei einem Vergleich der durchschnittlichen Eizellenanzahl pro Tier für die einzelnen Monate fielen die relativ schlechten Ergebnisse im Juli und September von durchschnittlich 11 und 15 Eizellen pro Tier auf. Der Durchschnitt der anderen Monate lag bei 20 Eizellen pro Tier. Im Gegensatz dazu beobachteten HAHN und GABLER (1971) bei Untersuchungen der jahreszeitlichen Variation des Superovulationsergebnisses in den Monaten Januar/Februar und November/Dezember einen deutlichen Abfall der Ergebnisse.

HAMMOND und MARSHALL (1925) beschrieben, daß die Zuchtsaison des Kaninchens von der Temperatur und dem verabreichten Futter abhängig ist. Bei Haltung von Kaninchen in einem nicht beheizten Stall wiesen sie nach, daß die Anzahl paarungsbereiter Häsinnen im Frühling und Sommer höher war als im Herbst und Winter. ASDELL (1946) fand, daß zwischen Juli und September, wenn die Außentemperatur am höchsten lag, die Fruchtbarkeit beim Kaninchen am ungünstigsten war. Er kam weiterhin zu dem Schluß, daß die Variation der Fruchtbarkeit beim Kaninchen mehr von den Temperaturschwankungen als von der Änderung der Tageslichtlänge beeinflusst wird. Auch SITTMANN et al. (1964) beobachteten, daß die Konzeptionsrate, die Größe der Würfe und der Anteil der Lebendgeborenen langsam vom Frühjahr zum Herbst zurückgingen. Als Ursache sahen sie ebenfalls die Außentemperatur an, da sich die Fortpflanzung normalisierte, sobald die Temperaturen unter die kritische Grenze von ca. 24° C abfielen.

Die Ergebnisse der eigenen Versuche zeigten, daß durch die Heizung und das Lichtprogramm der Einbruch des Superovulationsergebnisses im Winter sehr gut aufgefangen werden konnte. Der Abfall der Ergebnisse im Sommer ist wahrscheinlich auf den negativen Einfluß der nicht regulierbaren höheren Temperaturen zurückzuführen.

Bei 27 Spendertieren wurden die Eizellen in vivo durch einen operativen Eingriff gewonnen. Dabei konnten durchschnittlich 16 Eizellen pro Tier ausgespült werden. Bei der Eileiterspülung nach Schlachttötung der Spenderkaninchen konnten durchschnittlich 4 Eizellen mehr gewonnen werden. Dieser geringfügige Unterschied ist vermutlich auf einen Mangel an Routine bei der operativen Embryogewinnung zurückzuführen. ADAMS (1953) kam allerdings auch zu dem Ergebnis, daß die Eizellenausbeute

bei in vivo Eileiterspülung wesentlich geringer ist als bei Spülung des extirpierten Organs. MEIER (1972) hingegen konnte diesen Unterschied nicht feststellen.

Als Vorteil der chirurgischen Embryogewinnung sahen AVIS und SAWIN (1951) und MAURER et al. (1968a), daß die Spenderkaninchen mehrmals eingesetzt werden konnten. Demgegenüber zeigte sich bei den eigenen Versuchen ein hoher zeitlicher und materieller Aufwand bei der operativen Embryogewinnung gegenüber der Schlachtötung. Als nachteilig ist weiterhin die Tatsache zu werten, daß die in vivo gespülten Spendertiere bei der zweiten Superovulationsinduktion sehr häufig nicht mehr reagieren.

Sowohl ADAMS (1953) als auch MAURER et al. (1968a) beobachteten die Geburt von Jungtieren bei Spendern nach in vivo Spülung. Bei 4 Häsinnen, die in den eigenen Versuchen in vivo gespült wurden, stellten sich ebenfalls Trächtigkeiten ein. Diese Beobachtung weist darauf hin, daß bei der in vivo Spülung zum Teil noch Embryonen im Eileiter verblieben waren. Erstaunlicherweise war trotz der Irritationen durch den Spülvorgang und dem hormonellen Einfluß durch die Superovulation eine normale Trächtigkeit möglich.

150 Spendertiere wurden nach der Superovulation im natürlichen Deckakt belegt. Die restlichen 18 Spender wurden am Ende der Versuchsperiode mit Frischsperma besamt. ADAMS (1982b) beschrieb den weniger aufwendigen natürlichen Deckakt als Belegungsmöglichkeit von Spenderkaninchen ebenso wie den Einsatz der künstlichen Besamung für die Gewinnung von Kanichenembryonen. GABLER (1970), MEIER (1972) und STROJEK (1986) setzten nur die künstliche Besamung ein.

Die Befruchtungsrate der Eizellen, die aus allen 168 superovulierten Kaninchen gewonnen werden konnten, lag mit 63 % unter den in der Literatur beschriebenen Werten von 96 % (ADAMS, 1960) und 71 % (ROTTMANN und STRANZINGER, 1977).

Die Konzeptionsrate lag jedoch mit 81 % in dem Bereich der Werte, der in der Literatur für superovulierte, künstlich besamte Kaninchen mit durchschnittlich 80 % bis 95 % (ADAMS, 1961; SCHILLING und KÜMEL, 1985) angegeben wurden.

Die Ursache für die schlechte Befruchtungsrate bei den eigenen Versuchen lag zu einem großen Anteil darin, daß viele der Tiere, die nicht konzipiert hatten, mit einer besonders hohen Anzahl ovulierter Eizellen auf die hormonelle Superovulationsinduktion reagiert hatten. 66 % aller unbefruchteten Eizellen stammten von solchen Spenderkaninchen.

Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der Beobachtung, daß Häsinnen, die mit einer besonders hohen Anzahl an Ovulationen auf die Superovulationsinduktion reagierten, Störungen im Duldungsverhalten bei der Belegung zeigten. Diese Häsinnen hatten zum Belegungszeitpunkt ein stark durchblutetes äußeres Genitale und waren sehr lebhaft und zum Teil auch aggressiv. Im natürlichen Deckakt ritten sie oft auf das männliche Tier auf, duldeten jedoch den Aufsprung durch den Rammler nur sehr unwillig. Diese Tiere waren im natürlichen Deckakt nur sehr mühevoll zu belegen und erwiesen sich nach der Schlachtung oft als unbefruchtet.

Damit dieser Einfluß die Beurteilung des Befruchtungserfolgs von superovulierten Kaninchen nicht überlagert, wurde zusätzlich die Befruchtungsrate nur von denjenigen Spendertieren bestimmt, die konzipiert hatten. Diese korrigierte Befruchtungsrate betrug 83 %.

Am Ende der Versuchsperiode wurde die künstliche Besamung eingesetzt, da einige Häsinnen den Rammler nicht duldeten und es damit zu erheblichen technischen Schwierigkeiten bei der Belegung kam. Diese Schwierigkeiten wurden bei der künstlichen Besamung umgangen. Bei einem Vergleich der Ergebnisse zwischen den beiden Arten der Belegung ergab sich für die künstliche Besamung eine schlechtere Konzeptionsrate von 64 % gegenüber 83 % beim natürlichen Deckakt. Dies ist zum größten Teil auf die mangelnde Routine bei der Durchführung der künstlichen Besamung zurückzuführen. Bei erfolgreicher künstlicher Besamung waren jedoch 92 % der Eizellen befruchtet. Vergleichsweise war das Ergebnis beim natürlichen Deckakt mit 82 % befruchteten Eizellen signifikant ($p < 0,001$) geringer. Es zeigte sich, daß der Einsatz der künstlichen Besamung für die Gewinnung von Embryonen aus superovulierten Kaninchen der Belegung im natürlichen Deckakt überlegen ist.

Bei der Beurteilung des Trächtigkeitsergebnisses der durchgeführten Embryotransfers ergaben sich folgende Werte:

- Bei 12 Empfängerkaninchen von unbehandelten Kaninchenzygoten kamen 3 zur Geburt (TR:25 %).
- Bei 61 Empfängern von mikroinjizierten Zygoten wurden 18 Würfe beobachtet (TR:30 %).

Insgesamt kamen von 73 Empfängerkaninchen 21 zur Geburt. Die daraus resultierende Gesamtträchtigkeitsrate betrug 29 %.

Beim Transfer von Kaninchenembryonen im Zwei- bis Vierzellstadium wurden in der Literatur Trächtigkeitsraten von 91,6 %, bei Implantationskontrolle 25 bis 30 Tage nach dem Transfer (CHANG, 1948) bzw. 71 % bei Auswertung von Geburten (MAURER et al., 1968b) beschrieben. Bei Transferversuchen mit in vivo und in vitro fertilisierten Kaninchenzygoten erzielte AL HASANI (1980) Trächtigkeitsraten von 60 % bis 70 % bei der Implantationskontrolle 15 Tage nach dem Transfer. Die Ergebnisse der eigenen Versuche lagen damit wesentlich niedriger.

Eine Vielzahl vom Empfänger ausgehende Störungen werden bei Transferversuchen von Kaninchenembryonen in der Literatur beschrieben (siehe 2.1.4.3). GABLER (1970), die an der Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie an der Tierärztlichen Hochschule Hannover als erste Transplantationsversuche mit Kaninchenembryonen durchführte, begründete die niedrige Implantationsrate von 17,4 % zum Teil mit einem Mangel an Erfahrung bei der technischen Durchführung der Versuche. Die Hauptursache sah sie jedoch in der Verwendung von ungeeigneten Versuchstieren unbekannter Herkunft. Die niedrigen eigenen Transferergebnisse sind auf ähnliche Einflüsse zurückzuführen.

Einige der Faktoren, die die Trächtigkeit in den eigenen Versuchen beeinflusst haben, wurden erfaßt und ausgewertet. Diese Einflüsse haben sich zum Teil überlagert. Wegen der noch zu geringen Anzahl an Transfers konnten diese Überlagerungen bei der Auswertung noch nicht eliminiert werden.

Beim Einsatz von virginen Kaninchen zu Embryotransferversuchen empfahl ADAMS (1982b), die Tiere ca. 20 Tage vor Versuchsbeginn durch künst-

liche Ovulationsauslösung in Pseudogravidität zu versetzen. 21 Empfängerkaninchen wurden 3 Wochen vor der Synchronisation mit den Embryonenspendern vorovuliert. Ein Vergleich der Trächtigkeitsraten ergab 43 % Trächtigkeiten bei den vorovulierten Kaninchen gegenüber 23 % bei den anderen Tieren. Um dieses bessere Ergebnis für die vorovulierten Empfänger statistisch abzusichern, ist eine größere Anzahl von Versuchen notwendig.

Die Geschlechtsreife beim Kaninchen ist zweifelsfrei von der Rasse bzw. der Zuchtlinie abhängig (HAMMOND und MARSHALL, 1925). Beim Ankauf von Kaninchen von unterschiedlicher Herkunft ließ sich weder das Alter der Tiere bestimmen noch konnte festgestellt werden, ob es sich um frühreife oder spätreife Tiere handelte. Durch hormonelle Ovulationsinduktion wurde bei vorovulierten Kaninchen ein Zyklus induziert. Dadurch wurden die Ovarien in ihrer Funktion angeregt. Durch die ovariellen Hormone kam es zu einer Ausreifung der keimbewahrenden Organe. Damit war ein vorovuliertes Tier eher in der Lage, eine Trächtigkeit nach Transfer von Embryonen aufrecht zu erhalten, als ein Tier, bei dem noch niemals ein Zyklus abgelaufen war.

REEL et al. (1976) beschrieben Wirkungseinbußen bei der Ovulationsauslösung bei mehrmaliger Applikation von HCG durch die Ausbildung einer Immunität. Aus diesem Grund wurde die Dosis bei der Synchronisation von mit HCG vorovulierten Empfängerkaninchen auf 120 I.E. erhöht.

Die Anzahl der Corpora lutea des Empfängerkaninches hat einen Einfluß auf den Transfererfolg. Eine Anzahl von mindestens 5 funktionstüchtigen Corpora lutea pro Empfängertier wurde für das Gelingen eines Embryotransfers beim Kaninchen gefordert (STAPLES, 1971; MAURER et al., 1968b). Mit mindestens 8 Corpora lutea pro Empfänger wurde in den eigenen Versuchen eine Trächtigkeitsrate von 44 % erreicht. Mit 4 bis 7 Corpora lutea pro Empfänger kam es bei 7 Transfers noch zu einer Trächtigkeit (TR:14 %) und bei weniger als 4 Corpora lutea konnten keine Trächtigkeiten mehr erzielt werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtungen von DAUZIER (1962), daß mit zunehmender Anzahl der Corpora lutea die Voraussetzungen für eine Trächtigkeit besser werden. Wertvolle Versuchsembryonen sollten nur in Empfängerkaninchen übertragen werden, die mindestens 4 Ovulationsstellen pro Ovar aufweisen.

Beim Transfer der Embryonen in die Tuba wurden wahlweise 2 unterschiedliche Gerätetypen verwendet:

- Transferpettor (5 μ l)

Dieses starre Gerät bot den Vorteil, daß die Embryonen leicht in einem geringen Mediumvolumen aufgezogen werden konnten. Beim Transfer mit diesem Gerät kam es jedoch öfters zu Verletzungen des Gekröses und zu Blutungen der Fimbriae tubae. In einem Fall wurde sogar die Tuba perforiert. 23 % der Transfers mit dem Transferpettor führten zu einer Trächtigkeit.

- Transferpettorcap-Schlauch-Verbindungen (20 μ l)

Die Transferpettorcaps wurden durch den Unterdruck einer 1 ml Spritze befüllt. Der Druck beim Aufnehmen der Embryonen ließ sich mit diesem System nicht so leicht regulieren wie durch den Kolben des Transferpettors. Dadurch war das Aufnehmen der Embryonen erschwert. Die flexiblere Anordnung und die Krümmung bzw. Biegung an der Spitze des Caps erleichterten jedoch das Eingehen in die Tuba erheblich und reduzierten die Läsionen. Aus 37 % der Transfers mit der flexiblen Transferpettorcap-Schlauch-Verbindung resultierte eine Trächtigkeit.

Der Unterschied der Trächtigkeitsraten zeigte sich bei der statistischen Auswertung nicht signifikant. Dennoch bestand die Tendenz, daß aus dem Einsatz der flexibleren Transferpettorcap-Schlauch-Verbindungen bessere Transferergebnisse resultierten. Als Ursache dafür wurden die geringeren Läsionen des Tubenepithels und das weniger häufige Auftreten von Blutungen gewertet. Das Mediumvolumen lag bei den Transferpettorcaps mit 15 bis 20 μ l immer noch unter den in der Literatur mit 0,05 ml (CHANG, 1950) bzw. <0,5 ml (AVIS und SAWIN, 1951) angegebenen Werten.

Zur Untersuchung des jahreszeitlichen Einflusses auf die Trächtigkeitsrate wurde das Jahr in 4 Saisonen eingeteilt, um die Ergebnisse übersichtlich darzustellen. Die Zuordnung der einzelnen Monate zu den Saisonen wurde so gewählt, daß Monate mit ähnlichen Ergebnissen zusammengefaßt wurden.

Die Auswertung ergab, daß die Trächtigkeiten im Sommer und Winter mit

46 % signifikant ($p < 0,05$) höher lagen als im Frühjahr mit 0 % und im Herbst mit 8 %.

Der Vergleich der saisonalen Verteilung der Trächtigkeiten mit den saisonalen Unterschieden der Superovulationsreaktion ergab ein sehr uneinheitliches Bild. Während die Superovulationsergebnisse relativ gleichbleibend über das ganze Jahr verteilt waren, ergaben sich bei den Trächtigkeitsergebnissen signifikante Unterschiede zwischen den Saisonen. HAHN und AEHNELT (1972) stellten fest, daß die keimbewahrenden Organe sensibler auf Umwelteinflüsse reagieren als die keimbereitenden. Damit konnten die starken Schwankungen der Trächtigkeitsergebnisse begründet werden. Welcher jahreszeitlich bedingte Einfluß diese Schwankungen jedoch hervorgerufen hat, war unklar. Das völlige Ausbleiben von Trächtigkeiten im Frühling, der Jahreszeit, die in der Literatur einheitlich als die beste Fortpflanzungszeit für Kaninchen beschrieben wurde (HAMMOND und MARSHALL, 1925; ASDELL, 1946; SITTMANN et al., 1964), konnte nicht geklärt werden.

Für den Zygotentransfer beim Kaninchen lassen sich aus den Ergebnissen der eigenen Versuche folgende Schlüsse ziehen:

- Für die Superovulation sollten nur Kaninchen mit getesteten Superovulationseigenschaften eingesetzt werden. Die Haltung dieser Tiere in einem beheizten Stall mit Lichtprogramm schränkt die saisonale Variation dieser Ergebnisse ein.
- Bei der Befruchtung der Spendertiere ist der Einsatz der künstlichen Besamung und bei der Zygotengewinnung die Schlachttötung der Spender von Vorteil.
- Beim Transfer hat die Vorovulation der Empfängertiere den größten erfolgssteigernden Effekt neben dem Einsatz eines flexiblen Transfergerätes.

5.2 MIKROINJEKTION UND TRANSGENE TIERE

Weiteres Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluß von 4 verschiedenen Genkonstrukten auf die Entwicklungsfähigkeit von Kaninchenzygoten zu untersuchen und transgene Kaninchen mit diesen Genen zu erstellen. Von den 2000 insgesamt gewonnenen Zygoten wurden 1514 mikroinjiziert. Diese Anzahl verteilte sich folgendermaßen auf die eingesetzten Genkonstrukte:

- mMT₁-hGH: 576 Zygoten
- TO-CAT: 298 Zygoten
- hMT II_A-Mx: 128 Zygoten
- mMT₁-GRF: 512 Zygoten

Da die durch den Mikroinjektionsvorgang hervorgerufenen Schädigungen an den Embryonen zum großen Teil nicht unmittelbar nach der Manipulation beurteilt werden können, wurden die Zygoten nach der Manipulation noch für ca. 2 Stunden kultiviert. Anschließend wurden die degenerierten Embryonen aussortiert. Einige der intakten mikroinjizierten Zygoten teilten sich in dieser Kulturphase zum Zweizeller. Das zeigte, daß die Teilungsfähigkeit dieser Zygoten durch die Mikroinjektion nicht beeinträchtigt worden war.

15,5 % der mikroinjizierten Zygoten waren ca. 2 Stunden nach der Manipulation degeneriert. STROJEK (1986) beschrieb bei 5 % bis 10 % der Kaninchenzygoten Degenerationserscheinungen nach der Mikroinjektion einer Plasmidsuspension.

Die linearen Genfragmente mMT₁-hGH, TO-CAT, hMT II_A-Mx und mMT₁-GRF wurden zeitlich hintereinander zur Mikroinjektion eingesetzt. Die Degenerationsrate des hMT II_A-Mx war dabei mit 24 % am höchsten. Dieses Ergebnis war auf die Präparation der Genlösung zurückzuführen, die bei diesem Konstrukt starke Verunreinigungen aufwies. Damit die Fremdpartikel in der Genlösung die Injektionskapillare nicht verstopften, mußten stärkere Injektionspipetten verwendet werden. Dadurch wurden mehr Zygoten bei der Injektion geschädigt.

Die Degenerationsergebnisse der anderen Genkonstrukte nahmen in der Reihenfolge ihrer Verwendung zeitlich nacheinander von 21 % beim mMT₁-hGH, über 11 % beim TO-CAT, bis 10 % beim mMT₁-GRF ab. Dies war vermutlich auf die zunehmende Routine bei der Mikroinjektionstechnik zurückzuführen.

Ein Einfluß der Genkonzentration der Injektionslösungen auf die Degenerationsrate nach Mikroinjektion ließ sich nicht nachweisen. Zwar ergab sich die höchste Degenerationsrate für das 3000 Genkopien pro pl enthaltende hMT II_A-Mx. Die niedrigste Degenerationsrate trat jedoch bei der am zweithöchsten konzentrierten DNA-Lösung des mMT₁-GRF mit 2000 Kopien pro pl auf. Auch STROJEK (1986) konnte bei Untersuchungen der Überlebensfähigkeit mikroinjizierter Kaninchenzygoten in vitro keine Unterschiede der Ergebnisse zwischen 2000 und 4000 Fremdkopien pro Injektion feststellen.

Von den 61 Empfängern mikroinjizierter Embryonen wurden 18 trüchtig. Die daraus resultierende Trächtigkeitsrate lag mit 30 % über der Trächtigkeitsrate von 25 % bei Kontrolltransfers.

Die beim Transfer mikroinjizierter Zygoten erreichte Trächtigkeitsrate von 30 % ist mit den in der Literatur beschriebenen Werten von 39 % (STROJEK, 1986) und 33 % (BÜHLER et al., 1987) vergleichbar.

Die Ursache für die abfallenden Ergebnisse bei den Kontrolltransfers lag zum einen daran, daß diese Transfers zum größten Teil im Frühjahr durchgeführt wurden. In dieser Jahreszeit konnten aus ungeklärten Gründen keine Trächtigkeiten erzielt werden. Außerdem war keines der Empfängerkaninchen von Kontrollembryonen vorovuliert worden (siehe auch 5.1).

Bei Untersuchung des Einflusses der unterschiedlichen Genkonstrukte auf die Trächtigkeitsrate ergaben sich Werte zwischen 25 % und 36 %. Dieses Ergebnis deutet nicht darauf hin, daß ein Einfluß der unterschiedlichen Genkonstrukt-DNA-Lösungen auf die Trächtigkeitsrate der Empfänger mikroinjizierter Embryonen bestand. Die Variation der Trächtigkeitsraten dieser Auswertung sind durch Überlagerungen der anderen Faktoren, die das Trächtigkeitsergebnis beeinflussen, entstanden.

Die Anzahl mikroinjizierter Embryonen, die auf Empfängertiere übertragen wurden, spielte eine Rolle für das Zustandekommen von Trächtigkeiten. Es wurden von 6 bis zu 40 mikroinjizierte Zygoten pro Empfängertier transferiert. Bei der Übertragung von mehr als 20 manipulierten Embryonen wurde eine Trächtigkeitsrate von 50 % erreicht. Die Trächtigkeitsrate von Transfers mit weniger als 15 mikroinjizierten Zygoten war mit 11 % signifikant ($p < 0,05$) niedriger. Demgegenüber konnte STROJEK (1986) keine Beziehung zwischen der Anzahl übertragener Zygoten und der Anzahl der Implantationen bei Auswertung seiner Ergebnisse feststellen.

STROJEK (1986) und BÜHLER et al. (1987) transferierten durchschnittlich 12 mikroinjizierte Zygoten pro Empfängerkaninchen und erzielten Trächtigkeitsraten von 39 % und 33 %. HAMMER et al. (1985b) übertrugen durchschnittlich 26 mikroinjizierte Kaninchenembryonen pro Empfänger, machten jedoch keine Angaben über die Trächtigkeitsergebnisse. Unter den Bedingungen der eigenen Versuche lag die optimale Anzahl transferierter, mikroinjizierter Embryonen bei ca. 30 pro Empfänger.

Von den 1180 Zygoten, die ca. 2 Stunden nach der Mikroinjektion keine morphologischen Schäden aufwiesen, wurden 1143 auf Empfängerkaninchen übertragen. 6 % dieser Zygoten entwickelten sich zu Jungtieren. Diese Überlebensrate der mikroinjizierten Embryonen lag etwas unter den Werten, die in der Literatur mit 11,4 % (HAMMER et al., 1985b), 9,5 % (STROJEK, 1986) und 8,1 % (BÜHLER et al., 1987) angegeben wurden.

Damit die vielen Einflüsse, die die Trächtigkeitsrate beim Kaninchenembryotransfer beeinflussen, nicht das Ergebnis der Überlebensfähigkeit von Versuchsembryonen überlagerten, werteten AL-HASANI (1980) und STROJEK (1986) für die Implantations- und Weiterentwicklungsraten zu lebenden Jungen nur die tragenden Empfängertiere aus. Da die Transferergebnisse in den eigenen Versuchen besonders stark von Faktoren beeinflußt wurden, die in keinem Zusammenhang zur Behandlung der Embryonen stand, erfolgte in einer zweiten Auswertung die Korrektur der Überlebensrate auf die trächtig gewordenen Empfänger. 19 % aller mikroinjizierter Zygoten, die in tragend gewordene Empfängerkaninchen transferiert worden waren, hatten sich zu Jungtieren entwickelt.

STROJEK (1986) erreichte bei den korrigierten Werten eine Überlebensrate mikroinjizierter Kaninchenzygoten von durchschnittlich 15 %.

Die korrigierte Überlebensrate von unbehandelten Kontrollembryonen war mit 38 % signifikant ($p < 0,01$) höher als die der mikroinjizierten Zygoten. In diesem Vergleich der Überlebensraten drückt sich die herabgesetzte Entwicklungsfähigkeit mikroinjizierter Zygoten aus. Ebenso wurden häufig kleine Würfe von 1 oder 2 Jungen, verzögerte Geburtstermine und Kronismus beobachtet. Diese Beobachtung stützt obiges Ergebnis, daß eine relativ große Anzahl von ca. 30 mikroinjizierten Embryonen zur Erlangung eines optimalen Trächtigkeitsergebnisses transferiert werden sollten.

Erstaunlicherweise lag die korrigierte Überlebensrate der mit mMT_1 -hGH mikroinjizierten Zygoten mit 33 % nicht signifikant unter der Überlebensrate der Kontrollembryonen. Andererseits hob sich diese Überlebensrate signifikant ($p < 0,05$) von denen der anderen Genkonstrukte ab. Dies läßt vermuten, daß es einen Einfluß des Genkonstrukts auf die Überlebensfähigkeit der mikroinjizierten Zygoten gibt. BRINSTER et al. (1985) stellten bei Mäuseembryonen fest, daß die Injektion von geringen Gendosen (5 bis 520 Kopien pro Vorkern) zu in vitro Entwicklungsraten von ca. 80 % führten, während diese Rate bei Injektion von 5300 und mehr Genkopien auf 45 % absank. Dieser von der Genkonzentration abhängige Einfluß kann für die Erklärung der unterschiedlichen Überlebensraten der verschiedenen Genkonstrukte in den eigenen Versuchen nicht herangezogen werden. Die Überlebensrate nach Injektion der TO-CAT-Genlösung, welche mit ca. 300 Kopien pro pl am geringsten konzentriert war, lag deutlich ($p < 0,05$) unter dem Ergebnis der mMT_1 -hGH-Injektion.

Die Totgeburtenrate lag bei allen Jungtieren, die aus Mikroinjektion stammten, bei 56 %. STROJEK (1986) gab Aufzuchtstraten bis zum Absetzalter von 70,6 % und 55 % für Jungtiere aus mikroinjizierten Kaninchenzygoten an.

Vergleichsweise lag in den eigenen Versuchen die Totgeburtenrate von Jungtieren aus unbehandelten Kontrollembryonen mit 69 % höher als bei den Jungtieren aus Mikroinjektion. Die Jungtiere der Kontrollembryonen stammten allerdings nur aus 3 Würfen. Diese Anzahl ist zu gering, um dem Ergebnis große Aussagekraft zuzumessen.

Es ergaben sich folgende Ergebnisse für die Mikroinjektion der einzelnen Genkonstrukte:

- Bei Jungtieren aus hMT II_A-Mx lag die Totgeburtenrate mit 83 % signifikant ($p < 0,05$) am höchsten. Das weist auf die besonders hohe Schädigung der Kaninchenzygoten durch dieses Genkonstrukt hin, wie es sich bereits in der Degenerationsrate und auch der Überlebensrate dargestellt hat.
- Bei Jungtieren aus TO-CAT-Injektion war die Totgeburtenrate mit 23 % am geringsten. Das könnte auf die geringe Kopienzahl pro Injektion zurückzuführen sein. Diese Beobachtung widerspricht den Tendenzen, die bei der Auswertung der Überlebensrate festgestellt worden waren.
- Bei Jungtieren aus mMT₁-hGH-Injektion lag die Totgeburtenrate mit 63 % etwas über dem Mittelwert aller Genkonstrukte. Hier ließen sich keine Beziehungen zu den anderen Raten herstellen. Es waren relativ viele Embryonen unmittelbar nach der Injektion degeneriert, während die Überlebensrate signifikant ($p < 0,05$) über den Ergebnissen der anderen Genkonstrukte lag.
- Die Totgeburtenrate der Jungtiere aus mMT₁-GRF-Injektion lag mit 54 % sehr nahe dem Gesamtmittelwert. Auch hier bestand kein Zusammenhang zur Degenerationsrate bei Injektion dieses Genkonstrukts, die am niedrigsten im Vergleich zu den anderen Konstrukten war. Die korrigierte Überlebensrate fiel demgegenüber gegen die Ergebnisse der anderen Genkonstrukte ab.

Diese Widersprüche in den Ergebnissen deuten darauf hin, daß die Anzahl der Versuche für die einzelnen Genkonstrukte noch zu gering sind, um klare Aussagen über den Einfluß der verschiedenen Genkonstrukte auf die Entwicklungsfähigkeit von Kaninchenzygoten zu machen. Es lassen sich lediglich die oben dargestellten Tendenzen aufzeigen.

Bei DNA-Untersuchungen auf Integration des injizierten Fremdgens wurden bei 24 % der Jungtiere aus mMT₁-hGH-Injektion das fremde Gen im Genom nachgewiesen. HAMMER et al. (1985b) berichtete bei Injektion des selben Genkonstrukts in Kaninchenzygoten von 13 % Integration. STROJEK (1986) erreichte nach Injektion eines geschlossenen Vektorplasmids bei 41 % der Jungtiere die Integration der Fremd-DNA. Allerdings waren in diesem Fall die integrierten Fremdgenkopien bei 5 von 7 transgenen Kaninchen unvollständig oder strukturell verändert.

In der Literatur wurden bei der Erstellung transgener Mäuse durch DNA-Mikroinjektion Gesamteffektivitätsraten von 1 % bis maximal 6 % beschrieben (BRINSTER et al., 1985). In den eigenen Versuchen entwickelten sich aus den 576 mit mMT_1 -hGH mikroinjizierten Kaninchenzygoten 9 transgene Jungtiere. Daraus resultiert eine Gesamteffektivität von 1,6 %.

BRINSTER et al. (1985) stellten eine negative Korrelation zwischen Überlebensrate und Integrationsrate mikroinjizierter Mäusezygoten fest. Dies konnte in den eigenen Versuchen bei der Injektion des mMT_1 -hGH in Kaninchenzygoten nicht bestätigt werden. Dieses Genkonstrukt wies sowohl die beste Überlebensrate als auch die beste Integrationsrate im Vergleich zu den anderen Genkonstrukten auf.

Bei Untersuchung der 13 Kaninchen, die sich aus TO-CAT-Injektion entwickelt haben, konnte keine Fremdgenintegration nachgewiesen werden. BRINSTER et al. (1985) wiesen bei der Erstellung transgener Mäuse eine Steigerung der Integrationsraten von 4,2 % bei der Injektion von 5 Genkopien, auf 30 % bei der Injektion von 530 Kopien pro Vorkern nach. Die TO-CAT- Lösung war mit 300 Genkopien pro μl geringer konzentriert als die mMT_1 -hGH-Lösung. Die relativ geringe DNA-Konzentration könnte eine Ursache dafür gewesen sein, daß keines der 13 Jungtiere transgen war.

Eine Beurteilung der Integrationsrate des $hMT II_A$ -Mx und des mMT_1 -GRF war die Anzahl der geborenen Kaninchen noch zu gering. Bei einem von den Jungtieren aus mMT_1 -GRF-Injektion konnte die Integration des fremden Gens nachgewiesen werden.

Für den Gentransfer mit den 4 unterschiedlichen Genkonstrukten beim Kaninchen lassen sich aus den eigenen Versuchen folgende Aussagen machen:

- Auf das Trächtigkeitsergebnis mikroinjizierter Zygoten hatte nur die Anzahl der übertragenen Embryonen einen Einfluß. Die besten Ergebnisse wurden beim Transfer von ca. 30 manipulierten Zygoten pro Empfängerkaninchen erreicht. Die Genkonstrukte hingegen beeinflussten das Trächtigkeitsergebnis nicht.

- Auf die Entwicklungsfähigkeit der Zygoten und die Fremdgenintegration hatte die Art des Genkonstrukts einen Einfluß. So war die Überlebensrate und die Integration beim mMT_1 -hGH verglichen mit den anderen Konstrukten signifikant besser.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, die für den Gentransfer notwendigen Techniken der Gewinnung und des Transfers von Kaninchenzygoten zu untersuchen und transgene Kaninchen durch DNA-Mikroinjektion unterschiedlicher Genkonstrukte zu erstellen. Es konnten dabei folgende Ergebnisse ermittelt werden:

- Embryogewinnung

Nach Superovulation der Spenderkaninchen mit einer einmaligen Injektion von 20 bis 50 I.E. PMSG pro kg Körpergewicht wurden durchschnittlich 19 befruchtete und unbefruchtete Eizellen pro Spender gewonnen.

Die Superovulationsreaktion war abhängig von der Kaninchenrasse. So konnten von einer Rassegruppe mit durchschnittlich 33 Eizellen pro Tier signifikant ($p < 0,05$) mehr Eizellen gewonnen werden als von den anderen Rassegruppen.

Vorgenutzte Kaninchen reagierten zu 45 % nicht mehr auf die hormonelle Superovulationsinduktion.

Die jahreszeitlichen Schwankungen der Superovulationsreaktion konnten in der kalten Jahreshälfte durch den beheizten Stall weitgehend aufgefangen werden. In den Sommermonaten Juli und September konnten nur 11 bzw. 15 Eizellen gewonnen werden.

Das Ergebnis nach der Schlachttötung der Embryonenspender war mit durchschnittlich 20 Eizellen pro Spender etwas besser als das der in vivo Spülung mit 16 Eizellen pro Tier.

63 % der gewonnenen Eizellen waren befruchtet. Die Konzeptionsrate lag bei 81 %.

Die künstliche Besamung erwies sich gegenüber der Belegung im natürlichen Deckakt bei den superovulierten Kaninchen als überlegen. Die Durchführung der K.B. war problemloser und das Befruchtungsergebnis der Spendertiere die konzipiert hatten lag mit 92 % signifikant ($p < 0,001$) über dem Ergebnis der Belegung im natürlichen Deckakt von 82 %.

- Embryotransfer

Die Gesamtträchtigkeitsrate betrug 29 %.

Die Vorovulation der Empfängerkaninchen 21 Tage vor der Synchronisation mit den Spendern brachte eine Verbesserung der Trächtigkeitsrate von 23 % bei nicht vorovulierten Empfängern auf 43 %.

Die Anzahl der Corpora lutea des Empfängertieres hatte einen Einfluß auf das Trächtigkeitsergebnis. Mit mindestens 4 Corpora lutea pro Ovar konnte eine Trächtigkeitsrate von 44 % erreicht werden.

Eine geringfügige Verbesserung der Trächtigkeitsergebnisse ergab sich durch den Einsatz einer flexiblen Transferpettorcap-Schlauch-Verbindung (TR: 37 %) gegenüber der Verwendung eines Transferpettors als Übertragungsgerät (TR:23 %).

Unklar war der jahreszeitliche Einfluß auf das Trächtigkeitsergebnis. Im Sommer und Winter wurden Trächtigkeitsraten von 46 % erreicht, während in 2 aufeinanderfolgenden Jahren im Frühling keine Trächtigkeiten erzielt werden konnten.

- Mikroinjektion

Es wurden folgende 4 Genkonstrukte zur Mikroinjektion eingesetzt: mMT_1 -hGH, TO-CAT, $hMT II_A$ -Mx und mMT_1 -GRF.

Die Degenerationsrate nach der Mikroinjektion betrug durchschnittlich 15,5 %.

Es wurde eine Trächtigkeitsrate von 30 % nach Transfer mikroinjizierter Zygoten erreicht.

Die Anzahl mikroinjizierter Zygoten, die pro Empfänger übertragen wurden, hatten einen Einfluß auf das Trächtigkeitsergebnis. Die Trächtigkeitsrate stieg von 11 % beim Transfer von weniger als 15 mikroinjizierten Zygoten signifikant ($p < 0,05$) auf 50 % bei Übertragung von mehr als 20 manipulierten Embryonen.

Die Überlebensrate mikroinjizierter Zygoten (6 %) war im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzygoten (10 %) signifikant ($p < 0,05$) herabgesetzt.

56 % der Jungtiere, die sich aus mikroinjizierten Zygoten entwickelten, wurden tot geboren. Dieser Wert variierte zwischen 23 % beim TO-CAT und 83 % beim hMT II_A-Mx.

Von den 38 Jungtieren, die sich aus mMT₁-hGH-Injektion entwickelten, waren 9 (24 %) transgen. Bei den Jungtieren aus mMT₁-GRF Injektion war eines transgen.

7. SUMMARY

Production of transgenic rabbits by DNA microinjection into pronuclei of zygotes

Experiments were made in order to examine the appropriate techniques of gene transfer for collection and transfer of rabbit zygotes and produce transgenic rabbits by DNA microinjection of 4 different gene constructs. The following results were obtained:

- Embryocollection

Donor rabbits were superovulated with a single injection of 20 to 50 I.U. PMSG per kg body weight. An average of 19 fertilized and unfertilized ova per doe were obtained.

The results of superovulation depended on the strain. 33 ova per doe could be flushed from one strain. This result was significantly ($p < 0.05$) better than the results of the other strains.

45 % of the donor rabbits previously used did not respond to the superovulating hormones.

The seasonal variations of the reaction on the superovulation were nearly compensated by using a heated stable. Solely in July and September only 11 respectively 15 ova per animal were recovered.

The results after slaughtering the donors (an average of 20 ova per doe) were slightly better than the results after in vivo flushing with an average of 16 ova.

63 % of the ova collected were fertilized. The conception rate was 81 %.

The artificial insemination appeared to be superior to the natural cover of superovulated does. The performance was easier and the fertilization rate of donors which had conceived (92 %) was significantly ($p < 0.001$) higher than the results after natural cover (82 %).

- Embryotransfer

The total pregnancy rate was 29 %.

The pregnancy rate increased from 23 % to 43 % when a preovulation was induced in the recipient does 21 days before synchronisation.

The pregnancy results were influenced by the number of corpora lutea. A pregnancy rate of 44 % was obtained with at least 4 corpora lutea per ovar.

A little improvement of the pregnancy results was obtained by the use of a flexible transferpettorcap-tube-connection (PR:37 %), compared to the use of a transferpettor (PR:23 %).

The seasonal variations of the pregnancy results could not be explained. In summer and winter pregnancy rates of 46 % were obtained whereas in spring no pregnancies were obtained in 2 consecutive years.

- Microinjection

The following 4 geneconstructs were used for microinjection: mMT_1 -hGH, TO-CAT, $hMT\ II_A$ -Mx and mMT_1 -GRF.

The degeneration rate after microinjection was 15,5 %.

The pregnancy rate of microinjected zygotes was 30 %.

The pregnancy results were influenced by the number of microinjected zygotes transferred. The pregnancy rate increased significantly ($p < 0,05$) from 11 % transferring less than 15 manipulated zygotes to 50 % transferring more than 20.

The survival rate of microinjected zygotes (6 %) compared to untreated controlzygotes (10 %) decreased significantly ($p < 0,05$).

56 % of the offspring developed from microinjected zygotes were still born. This value varied between 23 % for TO-CAT to 83 % for $hMT\ II_A$ -Mx.

Nine (24 %) from 38 offspring developed from mMT_1 -hGH injection were transgenic. One transgenic rabbit was obtained by mMT_1 -GRF injection.

8. LITERATURVERZEICHNIS

ABDEL-FATTAH, S.M.S., 1979

Untersuchungen über die Brauchbarkeit von Mini-Pailletten zur Kultivierung und Übertragung von Kanincheneizellen unter Berücksichtigung des Einflusses von fetalem Kälberserum und Kaninchen-serum auf die Eientwicklung
Hannover: Diss. med. vet.

ADAMS, C.E., 1953

Some aspects of ovulation of ova in the immature rabbit
In: Mammalian germ cells, ed. WOLSTENHOLME, G.E.W.
London: Churchill, 198-212

ADAMS, C.E., 1956

A study of fertilization in the rabbit: The effect of post-coital ligation of the fallopian tube or uterine horn
J. Endocrin. 13, 296-308

ADAMS, C.E., 1958

Egg development in the rabbit: the influence of post-coital ligation of the uterine tube and of ovariectomy
J. Endocrin. 16, 283-293

ADAMS, C.E., 1960

Early embryonic mortality in the rabbit
J. Reprod. Fertil. 1, 315-316

ADAMS, C.E., 1961

Artificial insemination in the rabbit
J. Reprod. Fertil. 2, 521-522

ADAMS, C.E., 1962

Studies on prenatal mortality in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*: The effect of transferring varying numbers of eggs
J. Endocrin. 24, 471-490

ADAMS, C.E., 1965a

The influence of maternal environment on preimplantation stages of pregnancy in the rabbit

In: Preimplantation stages of pregnancy, ed. WOLSTENHOLME, G.E.W., M.O'CONNOR

London: Churchill, 345-372

ADAMS, C.E., 1965b

Influence of the number of corpora lutea on endometrial proliferation and embryo development in the rabbit

J. Endocr. 31, 29-30

ADAMS, C.E., 1968

Probleme der Eiübertragung bei Haustieren

Z. Tierz. Zücht. Biol. 84, 319-329

ADAMS, C.E., 1969

Egg-uterus interrelationships

In: Advances in the biosciences, 4, ed. RASPE, G.

Oxford: Pergamon Press, 149-162

ADAMS, C.E., 1970a

Maintenance of pregnancy relative to the presence of few embryos in the rabbit

J. Endocr. 48, 243-249

ADAMS, C.E., 1970b

The development of rabbit eggs after culture in vitro for 1-4 days

J. Embryol. exp. Morph. 23, 21-34

ADAMS, C.E., 1971

The fate of fertilized eggs transferred to the uterus or oviduct during advancing pseudopregnancy in the rabbit

J. Reprod. Fertil. 26, 99-111

ADAMS, C.E., 1980

Retention and development of eggs transferred to the uterus at various times after ovulation in the rabbit

J. Reprod. Fertil. 60, 309-315

ADAMS, C.E., 1982a

Egg transfer: Historical aspects

In: Mammalian egg transfer

Florida: CRC Press, 1-17

ADAMS, C.E., 1982b

Egg transfer in the rabbit

In: Mammalian egg transfer

Florida: CRC Press, 29-48

ADAMS, C.E., H.M. DOTT, 1966

Künstliche Besamung Pelztier und Nagetiere

Tierzüchter 18, 709-710

AL-HASANI, S.H., 1980

In vitro Befruchtungsversuche mit präovulatorischen

Kanincheneizellen

Hannover: Diss. med. vet.

ASDELL, S.A., 1946

Patterns of mammalian reproduction

Ithaca, New York: Cornell University Press

AUSTIN, C.R., 1961

The mammalian egg

Springfield, Illinois: Charles C. Thomas

AVIS, F.R., P.B. SAWIN, 1951

A surgical technique for the reciprocal transplantation of
fertilized eggs

J. Hered. 42, 259-260

BIEDL, A., H. PETERS, R. HÖFSTATTER, 1921

Experimentelle Studien über die Einnistung und Weiterentwicklung des
Eies im Uterus

Zeitschrift für Geburtshilfe und Gynäkologie 84, 59-130

BOCHOW, J., 1978

Untersuchungen über die Eizellkultivierung im abgebundenen Eileiter
des Kaninchens

Hannover: Diss. med. vet.

BRADEN, A.W.H., 1952

Properties of the membranes of rat and rabbit eggs

Aust. J. biol. Sci. Series B. Biol. Sci., 5, 460-471

BRADLEY, A., M. EVANS, M.H. KAUFMANN, E. ROBERTSON, 1984

Formation of germ-line chimeras from embryo-derived teratocarcinoma
cell lines

Nature 309, 255-256

BRAUN, J., 1977

Untersuchungen über den Einfluß der Superovulation auf Morphologie,
Kultivierung und Tiefgefrierkonservierung von Eizellen beim
Kaninchen

München: Diss. med. vet.

BREINDL, M., J. DOEHMER, K. WILLECKE, J. DAUSMANN, R. JAENISCH, 1979

Germ line integration of Moloney leukemia virus: identification of
the chromosomal integration site

Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 76, 1938-1942

BREM, G., 1986

Mikromanipulation an Rinderembryonen und deren Anwendungsmöglich-
keiten in der Tierzucht

Stuttgart: Ferdinand Enke

BREM, G., B. BREINIG, H.M. GOODMAN, R.C. SELDEN, F. GRAF, B. KRUFF,

K. SPRINGMANN, J. HONDELE, J. MEYER, E.-L. WINNACKER,

H. KRÄUßLICH, 1985

Production of transgenic mice, rabbits and pigs by microinjection
into pronuclei

Zuchthyg. 20, 251-252

- BREM, G., B. BRENIG, H.M. GOODMAN, R.C. SELDEN, F. GRAF, B. KRUFF,
K. SPRINGMANN, J. HONDELE, J. MEYER, E.-L. WINNACKER, H. KRÄUßLICH, 1986
Gene transfer in rabbits and pigs
3rd World Congrss on Genetics Applied to Livestock Production,
Lincoln, Nebraska, 16.-22.07.1986, Proc. XII, 45-50
- BRENIG, B., 1987
Klonierung mikroinjizierbarer Genkonstrukte und deren Nachweis in
transgenen Tieren - Ein Beitrag zur Nutzung transgener Tiere in der
Tierzucht
München: Diss. med. vet.
- BRINSTER, R.L., 1968
In vitro culture of mammalian embryos
J. Anim. Sci. 27, Suppl. I, 1-14
- BRINSTER, R.L., H.Y. CHEN, M. TRUMBAUER, 1981
Somatic expression of herpes thymidin kinase in mice following
injection of a fusion gene into eggs
Cell 27, 223-231
- BRINSTER, R.L., R.D. PALMITER, 1982
Induction of foreign genes in animals
Trends in Biochemical Science 7, 438-440
- BRINSTER, R.L., H.Y. CHEN, R. WARREN, A. SARTHY, R.D. PALMITER, 1982
Regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion plasmids
injected into mouse eggs
Nature 296; 39-42
- BRINSTER, R.L., R.D. PALMITER, 1984
The transfer of new genes into mice
In: Transfer and expression of eukaryotic genes
New York: Academic Press, 135-140
- BRINSTER, R.L., H.Y. CHEN, M.E. TRUMBAUER, M.K. YAGLE, R.D. PALMITER,
1985
Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into
mice by microinjecting eggs
Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 82, 4438-4442

BÜHLER, TH.A., TH. REDING, D.F. WENT, R. WEILEMANN, R. FRIES,
G. STRANZINGER, 1987

Microinjection of mouse IGM-genes into pronuclei of rabbit eggs
Theriogenology 27, 216

CHANG, M.C., 1948

Probability of normal development after transplantation of
fertilized rabbit ova stored at different temperatures
Proc. Soc. exp. Biol. 68, 680-683

CHANG, M.C., 1950

Development and fate of transferred rabbit ova or blastocysts in
relation to the ovulation time of recipients
J. exp. Zool. 114, 197-216

CHANG, M.C., 1951

Fertility and sterility as revealed in the study of fertilization
and development of rabbit eggs
Fertil. Steril. 2, 205-222

CHANG, M.C., 1952

Fertilizability of rabbit ova and the effects of temperature in
vitro on their subsequent fertilization and activation in vivo
J. exp. Zool. 121, 351-382

CHANG, M.C., S. PICKWORTH, 1969

Egg transfer in the laboratory animal
In: The mammalian oviduct, ed. BLANDAU, R.J., E.S.E. HAFEZ
Chicago, London: The University of Chicago Press, 389-405

CONSTANTINI, F., E. LACY, 1981

Introduction of a rabbit β -globin gene into the mouse germ line
Nature 294, 92-94

CRONMILLER, C., B., MINTZ, 1978

Karyotypic normalcy and quasi-normalcy of developmentally totipotent
mouse teratocarcinoma cells
Developm. Biol. 67, 465-477

DANIEL, J.C., Jr., 1968

Oxygen concentrations for culture of rabbit blastocysts
J. Reprod. Fertil. 17, 187-190

DAUZIER, L., 1962

Nouvelles données sur la transplantation des oeufs chez la lapine,
par voie vaginale ou intraperitoneale
Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys. 2, 17-23

DOWLING, D.F., 1949

Problems of the transplantation of fertilized ova
J. agric. Sci. 39, 374-396

DURNAM, D.M., R.D. PALMITER, 1981

Transcriptional regulation of the mouse metallothionein-I gene by
heavy metals
The Journal of Biological Chemistry 256, 5712-5716

EVANS, M.J., M.H. KAUFMANN, 1981

Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos
Nature 292, 154-156

FOOTE, R.H., H.D. HAFS, R.E. STAPLES, A.T. GREGOIRE, R.W. BRATON, 1963

Ovulation rates and litter sizes in sexually receptive and
nonreceptive artificially inseminated rabbits given varying dosages
of luteinizing hormone
J. Reprod. Fertil. 5, 59-66

FUJIMOTO, S., N. PAHLAVAN, W.R. DUKELOW, 1974

Chromosome abnormalities in rabbit preimplantation blastocysts
induced by superovulation
J. Reprod. Fertil. 40, 177-181

GABLER, G., 1970

Untersuchungen über die Gewinnung, Konservierung und Transplantation
von Eizellen bei Kaninchen unter Berücksichtigung von in vitro-
Befruchtungsversuchen
Hannover: Diss. med. vet.

- GORDON, J.W., G.A. SCANGOS, D.J. PLOTKIN, J.A. BARBOSA, F.H. RUDDLE, 1980
Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of
purified DNA
Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 77, 7380-7384
- GORDON, J.W., F.H. RUDDLE, 1981
Integration and stable germ line transmission of genes injected into
mouse pronuclei
Science 214, 1244-1246
- GOTTSCHESKI, G.H.M., W. ZIMMERMANN, 1973
Die Embryonalentwicklung des Hauskaninchens. Normogenese und
Teratogenese
Hannover: M. & H. Schaper
- GREENWALD, G.S., 1957
Interruption of pregnancy in the rabbit by the administration of
estrogen
J. exp. Zool. 135, 461-481
- GREENWALD, G.S., 1958
Endocrine regulation of the secretion of mucin in the tubal
epithelium of the rabbit
Anat. Rec. 130/3, 477-495
- GREENWALD, G.S., 1961a
The role of the mucin layer in development of the rabbit blastocyst
Anat. Rec. 142, 407-415
- GREENWALD, G.S., 1961b
A study of the transport of ova through the rabbit oviduct
Fertil. Steril. 12, 80-95
- GROVE, D., 1963
Eine künstliche Scheide zur Gewinnung des Samens vom Kaninchenbock
Dtsch. tierärztl. Wschr. 70, 492-494

HAFEZ, E.S.E., 1961

An experimental study of ova reception and some related phenomena in the rabbit

J. Morph. 108, 327-353

HAFEZ, E.S.E., 1962

Effect of progestational stage of the endometrium on implantation, fetal survival and fetal size in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*

J. exp. Zool. 151, 217-225

HAFEZ, E.S.E., 1971

Egg storage

In: Methods in mammalian embryology, ed. DANIEL, J.C.Jr.

San Francisco: H. Freeman, 117-132

HAGER, L.J., R.D. PALMITER, 1981

Transcriptional regulation of mouse liver metallothionein-I gene by glucocorticoids

Nature 291, 340-342

HAHN, J., G. GABLER, 1971

Die Fruchtbarkeit weiblicher Kaninchen unter Berücksichtigung individueller und jahreszeitlicher Schwankungen

Züchtungskunde 43, 456-462

HAHN, J., E. AEHNELT, 1972

Nachweis von schädlichen Nahrungsfaktoren im Kaninchenversuch

Dtsch. tierärztl. Wschr. 79, 145-176

HAHN, J., U. MEIER, 1973

Versuchsdurchführung und Ergebnisse von Eitransplantationen beim Kaninchen

Zuchthyg. 8, 22-31

HAHN, J., G. ADY, U. SCHNEIDER, 1977

Über den Einfluß der Superovulation auf die Entwicklung in-vitro befruchteter Kanincheneizellen

Dtsch. tierärztl. Wschr. 84, 232-233

HAM, R.G., 1963

An improved nutrient solution for diploid chinese hamster and human cell lines

Exp. Cell. Res. 29, 515-526

HAMMER, R.E., R.D. PALMITER, R.L. BRINSTER, 1984

Partial correction of murine hereditary growth disorder by germ-line incorporation of a new gene

Nature 311, 65-67

HAMMER, R.E., R.L. BRINSTER, M.G. ROSENFELD, R.M. EVANS, K.E. MAYO, 1985a

Expression of human growth hormone-releasing factor in transgenic mice results in increased somatic growth

Nature 315, 413-416

HAMMER, R.E., V.G. PURSEL, C.E. REXROAD Jr., R.J. WALL, D.J. BOLT, K.M. EBERT, R.D. PALMITER, R.L. BRINSTER, 1985b

Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection

Nature 315, 680-683

HAMMOND, J., F.H.A. MARSHALL, 1925

Reproduction in the rabbit

Edinburgh, London: Oliver & Bond

HARBERS, K., A. SCHNIKE, H. STUHLMANN, D. JÄHNER, R. JAENISCH, 1981a

DNA methylation and gene expression: endogenous retroviral genome becomes infectious after molecular cloning

Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 78, 7609-7613

HARBERS, K., D. JÄHNER, R. JAENISCH, 1981b

Microinjection of cloned retroviral genomes into mouse zygotes: integration and expression in the animal

Nature 293, 540-542

HARPER, M.J.K., 1963

Ovulation in the rabbit: The time of follicular rupture and expulsion of the eggs, in relation to injection of luteinizing hormone

J. Endocrin. 26, 307-316

HEAPE, W., 1891

Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster mother
Proc. R. Soc. 48, 457-458

HERTZ, R., F.L. HISAW, 1934

Effects of follicle-stimulating and luteinizing pituitary extracts on the ovaries of the infantile and juvenile rabbit
Amer. J. Physiol. 108, 1-13

ILLMENSEE, K., B. MINTZ, 1976

Totipotency and normal differentiation of single teratocarcinoma cells cloned by injection into blastocysts
Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 73, 549-553

ILLMENSEE, K., P.C. HOPPE, 1981

Nuclear transplantation in mus musculus: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos
Cell 23, 9-18

JÄHNER, D., R. JAENISCH, 1980

Integration of Moloney leukaemia virus into the germ-line of mice: correlation between site of integration and virus activation
Nature 287, 456-458

JAENISCH, R., 1976

Germ-line integration and mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus
Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 73, 1260-1264

JAENISCH, R., 1977

Germ-line integration of Moloney leukemia virus: effect of homozygosity at the M-MuLV locus
Cell 12, 691-696

JAENISCH, R., B. MINTZ, 1974

Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA
Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 71, 1250-1254

JAENISCH, R., H. FAN, B. CROKER, 1975

Infection of preimplantation mouse embryos and of newborn mice with leukemia virus: Tissue distribution of viral DNA and RNA and leukemogenesis in the adult animal

Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 72, 4008-4012

JAENISCH, R., D. JÄHNER, P. NOBIS, I. SIMON, J. LÖHLER, K. HARBERS, D. GROTKOPP, 1981

Chromosomal position and activation of retroviral genomes inserted into the germ-line of mice

Cell 24, 519-529

KANE, M.T., R.H. FOOTE, 1970a

Culture of two- and four-cell rabbit embryos to the blastocyst stage in serum and serum extracts

Biology of Reproduction 2, 245-250

KANE, M.T., R.H. FOOTE, 1970b

Culture of two- and four-cell rabbit embryos to the expanding blastocyst stage in synthetic media

Proc. Soc. exp. Biol. 133, 921-925

KANE, M.T., R.H. FOOTE, 1970c

Fractionated serum dialysate and synthetic media for culturing two- and four-cell rabbit embryos

Biology of Reproduction 2, 356-362

KANE, M.T., R.H. FOOTE, 1971

Factors affecting blastocyst expansion of rabbit zygotes and young embryos in defined media

Biology of Reproduction 4, 41-47

KENNELLY, J.J., R.H. FOOTE, 1965

Superovulatory response of pre- and post-puberal rabbits to commercially available gonadotropins

J. Reprod. Fertl. 9, 177-188

KRÄUßLICH, H., 1986

Criteria for useful gene transfer

3rd World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Lincoln, Nebraska, 16.-22.07.86, Proc. XII, 22-31

KRISHNAN, R.S., J.C. DANIEL Jr., 1967

"Blastokinin": Inducer and regulator of blastocyst development in the rabbit uterus

Science 158, 490-492

LEWIS, W.H., P.W. GREGORY, 1929

Cinematographs of living developing rabbit-eggs

Science 69, 226-229

LIN, T.P., 1966

Microinjection of mouse eggs

Science 151, 333-337

LOW, M.J., R.E. HAMMER, R.H. GOODMAN, J.F. HABENER, R.D. PALMITER, R.L. BRINSTER, 1985

Tissue-specific posttranslational processing of pre-prosomatostatin encoded by a metallothionein-somatostatin fusion gene in transgenic mice

Cell 41, 211-219

LOW, M.J., R.M. LECHAN, R.E. HAMMER, R.L. BRINSTER, J.F. HABENER, G. MANDEL, R.H. GOODMAN, 1986

Gonadotroph-specific expression of metallothionein fusion genes in pituitaries of transgenic mice

Science 231, 1002-1004

MANN, R., R.C. MULLIGAN, D. BALTIMORE, 1983

Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus

Cell 33, 153-159

MAURER, R.R., W.L. HUNT, R.H. FOOTE, 1968a

Repeated superovulation following administration of exogenous gonadotrophins in dutch-belted rabbits

J. Reprod. Fertil. 15, 93-102

MAURER, R.R., W.L. HUNT, L.D. VAN VLECK, R.H. FOOTE, 1968b

Developmental potential of superovulated rabbit ova

J. Reprod. Fertil. 15, 171-175

MAURER, R.R., H. ONUMA, R.H. FOOTE, 1970

Viability of cultured and transferred rabbit embryos
J. Reprod. Fertil. 21, 417-422

MAURER, R.R., R.H. FOOTE, 1971

Maternal aging and embryonic mortality in the rabbit
J. Reprod. Fertil. 25, 329-341

MEIER, U., 1972

Transplantation von frisch gewonnen und kultivierten Kaninchenei-
zellen verschiedener Entwicklungsstadien
Hannover: Diss. vet. med.

MICHELMANN, H.W., S.K. PAUFLER, 1973

Besamungsergebnisse nach Anwendung von LH-RH beim Kaninchen
Zuchthyg. 8, 178

MICHELMANN, H.W., S.K. PAUFLER, 1974

Untersuchung über die normale hormonelle Ovulationsauslösung und
die Superovulation beim Kaninchen
Zuchthyg. 9, 116-121

MINTZ, B., 1979

Teratocarcinoma cells as vehicles for introducing mutant genes into
mice
Differentiation 13, 25-27

MINTZ, B., 1983

Changing the genes of mice
In: Advances in gene technology: molecular genetics of plants and
animals
New York: Academic Press, 415-425

MINTZ, B., K. ILLMENSEE, 1975

Normal genetically mosaic mice produced from malignant
teratocarcinoma cells
Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 72, 3585-3589

MINTZ, B., C. CRONMILLER, 1981

METT-1: A karyotypically normal in vitro line of developmentally
totipotent mouse teratocarcinoma cells
Somat. Cell. Genet. 7, 489-505

NAGLEE, D.L., R.R. MAURER, R.H. FOOTE, 1969

Effect of osmolarity on in vitro development in a chemically defined
medium
Exp. Cell Res. 58, 331-333

NICHOLAS, J.C., 1933

Development of transplantated rat eggs
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 30, 1111-1113

ONUMA, H., R.R. MAURER, R.H. FOOTE, 1968

In vitro culture of rabbit ova from early cleavage stages to the
blastocyst stage
J. Reprod. Fertil. 16, 491-493

PALMITER, R.D., H.Y. CHEN, R.L. BRINSTER, 1982a

Differential regulation of metallothionein-tymidin kinase fusion
genes in transgenic mice and their offspring
Cell 29, 701-710

PALMITER, R.D., R.L. BRINSTER, R.E. HAMMER, M.E. TRUMBauer,
M.G. ROSENFELD, N.C. BIRNBERG, R.M. EVANS, 1982b

Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with
metallothionein-growth hormone fusion genes
Nature 300, 611-615

PALMITER, R.D., G. NORSTEDT, R.E. GELINAS, R.E. HAMMER, R.L. BRINSTER
1983

Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice
Science 222, 809-814

PARKES, A.S., 1942

Induction of superovulation and superfecundation in rabbits
J. Endocrin. 3, 268-279

PINCUS, G., 1940

Superovulation in rabbits

Anat. Rec. 77, 1-8

PINCUS, G., N.T. WERTHESEN, 1938

The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro

J. exp. Zool. 78, 1-18

PURSHOTTAM, N., G. PINCUS, 1961

In vitro cultivation of mammalian eggs

Anat. Rec. 140, 51-55

REEL, J.R., R.R. HUMPHREY, M.S. and W.C. DERMODY, 1976

Luteinizing hormone-releasing hormone versus human chorionic gonadotropin: differential effect on the development of ovulatory refractoriness and antibodies

Fertil. Steril. 27, 59-64

RENKAWITZ, R., 1986

Persönliche Mitteilung

ROBERTSON, E., A. BRADLEY, M. KUEHN, M. EVANS, 1986

Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotent cells by retroviral vector

Nature 323, 445-448

ROLOFF, V., 1976

Transplantationsversuche mit frisch gewonnenen und kultivierten Kaninchenblastozysten

Hannover: Diss. vet. med.

ROTTMANN, O., 1978

Untersuchungen über die Embryonenmanipulation an vorimplantären Entwicklungsstadien des Kaninchens (*Oryctolagus cuniculus* L.)

München: Diss. agr.

ROTTMANN, O., G. STRANZINGER, 1977

Ergebnisse der Superovulation bei Kaninchen durch einmalige PMSG Applikation bei zwei Zuchtlinien

Zuchthyg. 12, 14-18

SCHILLING, E., 1986

Persönliche Mitteilung

SCHILLING, E., M. KÜMEL, 1985

Entwicklungsfähigkeit superovulierter Kanincheneier in vivo und in vitro

Zuchthyg. 20, 135

SITTMANN, D.B., W.C. ROLLINS, K. SITTMANN, R.B. CASADY, 1964

Seasonal variation in reproductive traits of new zealand white rabbits

J. Reprod. Fertil. 8, 29-37

STAEHLI, P., O. HALLER, W. BOLL, J. LINDENMANN, CH. WEISSMANN, 1986

Mx-protein: Constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus

Cell 44, 147-158

STAPLES, R.E., 1971

Blastocyst transplantation in the rabbit

In: Methods in mammalian embryology, ed. DANIEL, J.C., Jr.

San Francisco: W.H. Freeman, 290-304

STEVENS, L.C., 1970

The development of transplantable teratocarcinomas from

intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos

Developm. Biol. 21, 364-382

STEWART, C., K. HARBERS, D. JÄHNER, R. JÄNISCH, 1983

X chromosome-linked transmission and expression of retroviral genomes microinjected into mouse zygotes

Science 221, 760-762

STEWART, C.L., M. VANEK, E.F. WAGNER, 1985

Expression of foreign genes from retroviral vectors in mouse teratocarcinoma chimeras

EMBO-J. 4, 3701-3709

STEWART, T.A., B. MINTZ, 1981

Successive generations of mice produced from an established culture line of euploid teratocarcinoma cells
Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 78, 6314-6318

STROJEK, R.M., 1986

Versuche zur Einschleusung von Uteroglobulin-Promotor-CAT-Fusionsgenen in Kanincheneizellen im Hinblick auf die Erstellung transgener Tiere
Hannover: Diss. med. vet.

STUHLMANN, H., R. CONE, R.C. MULLIGAN, R. JAENISCH, 1984

Introduction of a selectable gene into different animal tissue by a retrovirus recombinant vector
Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 81, 7151-7155

TESTART, J., 1969

Comparison de differentes techniques de transplantation des blastocysts chez la lapine
Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys. 9, 351-360

TSUTSUMI, Y., T. TAKEDA, K. YAMAMOTO, Y. TANABE, 1976

Nonsurgical recovery of fertilized eggs from the vagina of oestrogentreated rabbits
J. Reprod. Fertil. 48, 393-395

TSUTSUMI, Y., Y. TERAMI, T. TAKEDA, M. SUZUKI, S. MATUSI, 1980

In vivo egg recovery from the vagina and the pattern of egg distribution in superovulated rabbits
Jap. J. Anim. Reprod. 26, 6, (zitiert nach ADAMS 1982b)

VAN DER PUTTEN, H., F.M. BOTTERI, A.D. MILLER, M.G. ROSENFELD, H. FAN, R.M. EVANS, I.M. VERMA, 1985

Efficient insertion of genes into the mouse germ-line via retroviral vectors
Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 82, 6148-6152

VENGE, O., 1952

A method for continuous chromosome control of growing rabbits
Nature 169, 590-591

WAGNER, E.F., T.A. STEWART, B. MINTZ, 1981

The human β -globin gene and a functional viral thymidine kinase gene
in developing mice

Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 78, 5016-5020

WAGNER, T.E., P.C. HOPPE, J.D. JOLLIICK, D.R. SCHOLL, R.L. HODINKA,
J.B. GAULT, 1981

Microinjection of a rabbit β -globin gene into zygotes and its
subsequent expression in adult mice and their offspring

Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 78, 6376-6380

WATANABE, T., M.J. DEWEY, B. MINTZ, 1978

Teratocarcinoma cells as vehicles for introducing specific mutant
mitochondrial genes into mice

Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 75, 5113-5117

WATSON, J.D., J. TOOZE, D.T. KURTZ, 1986

Recombinierte DNA: Eine Einführung

Heidelberg: Spektrum-der-Wissenschaft-Verlagsgesellschaft, 2.Auflage

YANG, X., M. BATTISTA, W. POPE, M. SIMKIN, H.J. VOSS, R.H. FOOTE, 1985

Asynchronous embryotransfer to day-4 recipient rabbits

Theriogenology 23, 293

YANG, X., M. SIMKIN, M. BATTISTA, B. WILCOX, R.H. FOOTE, 1986

Asynchronous embryotransfer in rabbits

Theriogenology 25, 219

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. G. Brem für die Überlassung des Themas sowie für die verständnisvolle Beratung und Unterstützung bei der Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich ferner bei Frau B. Rengel, Frau T. Holy sowie allen Doktoranden und Mitarbeitern im Labor für die stets gewährte Hilfeleistung und freundliche Zusammenarbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Stanglmeier für die Bereitstellung der EDV-Auswertungsprogramme.

Der Dr. Dr. h.c. Karl-Eibl-Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

LEBENS LAUF

Von: Karin, Eva ROSS

geboren am 9. März 1960 in München

Vater: Dr. Dietrich Ross, Diplomchemiker

Mutter: Renate Ross, geb. Völker

1966 - 1968: Besuch der Grundschule an der Wallieser Straße
in München Fürstenried

1968 - 1970: Besuch der Grundschule des Katholischen Familienwerks e.V.
in München Schwabing

1970 - 1979: Besuch des städtischen Bertolt-Brecht-Gymnasiums
in München Pasing

27.06.1979 : Allgemeine Hochschulreife

1979 - 1985: Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians
Universität München

16.08.1985 : Staatsexamen

28.01.1986 : Approbation als Tierarzt

Seit Okt. 1985 Doktorand am Institut für Tierzucht und Tierhygiene
der Ludwig-Maximilians Universität München.

